



Etude de la biodiversité des Sargassaceae (Fucales, Phaeophyceae) en milieux tempérés et tropicaux : écologie, chimiotaxonomie et source de composés bioactifs

Klervi Le Lann

► To cite this version:

Klervi Le Lann. Etude de la biodiversité des Sargassaceae (Fucales, Phaeophyceae) en milieux tempérés et tropicaux : écologie, chimiotaxonomie et source de composés bioactifs. Autre [q-bio.OT]. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2009. Français. NNT : . tel-00976868

HAL Id: tel-00976868

<https://theses.hal.science/tel-00976868>

Submitted on 10 Apr 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE / UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

sous le sceau de l'Université européenne de Bretagne

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

Mention : Biologie Marine

École Doctorale des Sciences de la Mer

présentée par

Klervi Le Lann

Préparée à l'Institut Universitaire Européen de la Mer
Laboratoire d'Ecophysiologie et de Biotechnologie des
Halophytes et des Algues Marines (EA 3877)

**Etude de la biodiversité des
Sargassaceae (Fucales,
Phaeophyceae) en milieux
tempéré et tropical :
écologie, chimiotaxonomie et
source de composés bioactifs**

Soutenance prévue le 27 novembre 2009

Devant le jury composé de :

Mme Nathalie Bourgougnon

Professeur des Universités, Université de Bretagne Sud
/ Rapporteur

Mr Gérald Culioli

Maître de Conférences, Université du Sud-Toulon-Var
/ Rapporteur

Mme Claude Payri

Professeur des Universités, IRD de Nouméa
/ Examineur

Mr Jacques Clavier

Professeur des Universités, Université de Bretagne Occidentale
/ Examineur

Mr Stéphane Labarre

Chargé de Recherche, Station Biologique de Roscoff-UPMC
/ Examineur

Mme Valérie Stiger-Pouvreau

Maître de Conférences, Université de Bretagne Occidentale
/ Directrice de thèse

Mme Nelly Kervarec

Ingénieur d'étude, Université de Bretagne Occidentale
/ Invitée

Mr Edouard Kraffe

Maître de Conférences, Université de Bretagne Occidentale
/ Invité

Thèse de Doctorat
Université de Bretagne Occidentale
Ecole Doctorale des Sciences de la Mer

Présentée par

Klervi Le Lann

En vue de l'obtention du titre de Docteur de l'Université de Bretagne Occidentale
Spécialité Biologie Marine

Etude de la biodiversité des Sargassaceae (Fucales, Phaeophyceae) en milieux tempéré et tropical : écologie, chimiotaxonomie et source de composés bioactifs



Soutenance prévue le 27 novembre 2009, devant le jury composé des membres suivants :

Mme Nathalie Bourgougnon, Professeur des Universités, Université de Bretagne Sud / *rapporteur*

Mr Gérald Culioli, Maître de Conférences, Université du Sud-Toulon-Var / *rapporteur*

Mr Jacques Clavier, Professeur des Universités, Université de Bretagne Occidentale / *examinateur*

Mr Stéphane Labarre, Chargé de Recherche, Station Biologique de Roscoff-UPMC / *examinateur*

Mme Valérie Stiger-Pouvreau, Maître de Conférences, Université de Bretagne Occidentale / *Directrice de thèse*

Mme Nelly Kervarec, Ingénieur d'étude, Université de Bretagne Occidentale / *invitée*

Mr Edouard Kraffe, Maître de Conférences, Université de Bretagne Occidentale / *invité*

A mon père

Le souvenir, c'est la présence invisible (Victor Hugo)

«Vagabonder à la surface des océans
est souvent source de sérénité et,
parfois, permet de tutoyer ses rêves.
Si immerger, c'est s'ouvrir à son
observation et à sa compréhension.»

Nicolas Hulot

- Extrait de la revue *Ma planète* (mai/juin 1998)-

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES.....	6
LISTE DES TABLEAUX	12
AVANT-PROPOS	14
INTRODUCTION GENERALE.....	17
Position de la famille des Sargassaceae dans l’arbre du vivant.....	19
La Biodiversité : une notion complexe.....	21
Intérêts des macroalgues pour divers secteurs industriels	22
Contexte, objectifs de cette étude et plan du manuscrit.....	27
CHAPITRE I : CONTEXTE GENERAL DE L’ETUDE : SITES D’ECHANTILLONNAGE ET MODELES BIOLOGIQUES	31
1. Présentation des sites d’échantillonnage	33
1.1. Généralités sur la colonne d'eau.....	33
1.2. Zones géographiques étudiées	34
1.2.1. La Bretagne et son littoral	35
1.2.2. Le Pacifique Sud et les archipels étudiés	42
1.3. Sites étudiés en Bretagne	46
1.3.1. La Pointe du Diable.....	46
1.3.2. L’anse de Porsmeur.....	48
1.3.3. Comparaison des deux sites	49
1.4. Sites étudiés dans le Pacifique Sud	51
1.4.1. Les îles Salomon	52
1.4.2. La Nouvelle Calédonie.....	54
1.4.3. Les îles Fidji.....	56
2. Présentation des modèles biologiques.....	58
2.1. Position taxonomique et richesse spécifique de la famille des Sargassaceae	58
2.2. Importances écologique et économique.....	61
2.3. Reproduction et cycle de développement	63
2.4. Distribution géographique et richesse spécifique des genres étudiés.....	64
2.4.1. <i>Bifurcaria</i>	66
2.4.2. <i>Cystoseira</i>	66
2.4.3. <i>Sargassum</i>	66
2.4.4. <i>Turbinaria</i>	67
2.5. Description des espèces étudiées en Bretagne	67
2.5.1. Choix des espèces	67
2.5.2. <i>Sargassum muticum</i>	68
2.5.3. <i>Cystoseira baccata</i>	71
2.5.4. <i>Bifurcaria bifurcata</i>	72
2.6. Description des espèces étudiées dans le Pacifique Sud	74

2.6.1.	Choix des espèces	74
2.6.2.	Espèces du genre <i>Sargassum</i>	75
2.6.3.	Espèces du genre <i>Turbinaria</i>	75
CHAPITRE II : ECOLOGIE CHIMIQUE DES SARGASSACEAE		79
Introduction.....		81
1. Matériel et méthodes		87
1.1.	Optimisation du conditionnement en vue du démarrage de l'étude des composés phénoliques et des activités antioxydantes associées	87
1.2.	Suivis écologiques des populations	88
1.2.1.	Echantillonnage en milieu tempéré	88
1.2.2.	Echantillonnage en milieu tropical	90
1.3.	Extraction des molécules de défense	91
1.3.1.	Extraction des composés phénoliques	91
1.3.2.	Extraction de la fucoxanthine.....	92
1.4.	Dosage des molécules de défense	92
1.4.1.	Dosage des composés phénoliques	92
1.4.2.	Mise au point du dosage de la fucoxanthine	93
1.4.3.	Dosage des activités antioxydantes	94
1.4.3.1.	Détermination de l'activité anti-radicalaire par le test du DPPH.....	94
1.4.3.1.1.	Dosage de l'activité antiradicalaire par spectrophotométrie.....	94
1.4.3.1.2.	Estimation de l'activité antiradicalaire sur plaque CCM.....	95
1.4.3.2.	Détermination de l'activité antioxydante par la méthode des β -carotène sur microplaque.....	95
1.5.	Séparation des classes de taille des composés phénoliques	96
1.6.	Analyses statistiques	99
2. Résultats		99
2.1.	Optimisation du conditionnement en vue du démarrage de l'étude des composés phénoliques et de l'activité antioxydante associée.....	99
2.2.	Suivi écologique et écologie chimique de Sargassaceae tempérées.....	108
2.2.1.	Suivi spatio-temporel des populations	108
2.2.2.	Etude des classes de taille des composés phénoliques	135
2.2.3.	Variations spatio-temporelles des teneurs en fucoxanthine	137
2.2.4.	Estimation de l'activité antiradicalaire des extraits pigmentaires des Sargassaceae tempérées	140
2.3.	Ecologie chimique de Sargassaceae tropicales	141
2.3.1.	Variabilité spatiale des teneurs en composés phénoliques	141
2.3.2.	Etude des classes de taille des composés phénoliques	163
2.3.3.	Variations spatiales des teneurs en fucoxanthine	165
2.3.4.	Estimation de l'activité antiradicalaire des extraits pigmentaires	166
2.4.	Comparaison du système « tempéré » et du système « tropical »	167
3. Discussion		167
3.1.	Importance du conditionnement pour l'étude des composés phénoliques et leur activité antioxydante associée	167
3.2.	Ecologie chimique des 3 genres de Sargassaceae de milieu tempéré	168
3.2.1.	Suivi spatio-temporel des populations	168

3.2.2.	Molécules de défense	170
3.2.2.1.	Etude des classes de taille des composés phénoliques	170
3.2.2.2.	Variabilité de la fucoxanthine	171
3.3.	Ecologie chimique de 2 genres de Sargassaceae en milieu tropical	172
3.3.1.	Suivi spatial des populations	172
3.3.2.	Molécules de défense	173
3.3.2.1.	Classes de taille des composés phénoliques	173
3.3.2.2.	La fucoxanthine	174
3.4.	Comparaison du système « tempéré » et du système « tropical »	175
Conclusion- Synthèse.....		176
CHAPITRE III : CHIMIOTAXONOMIE.....		177
Introduction.....		179
1. Distinction interspécifique par isolement de chimiomarqueurs au sein du genre <i>Turbinaria</i>		180
1.1.	Etat de l'art et problématique	180
1.2.	Matériels et méthodes	182
1.2.1.	Démarche expérimentale	182
1.2.2.	Obtention d'empreinte chimique par résonance magnétique nucléaire <i>in vivo</i>	184
1.2.3.	Obtention d'empreinte chimique par RMN des solutions (¹ H-RMN)	184
1.2.4.	Extraction des lipides	185
1.2.5.	Analyses des extraits lipidiques en chromatographie sur couche mince	185
1.2.6.	Séparation des différentes classes de lipides	187
1.2.7.	Analyses en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse	187
1.2.8.	Analyses RMN	188
1.3.	Résultats	189
1.3.1.	Empreintes chimiques par RMN <i>in vivo</i>	189
1.3.1.1.	Mise au point de la technique utilisant la ¹ H RMN HR-MAS	189
1.3.2.	Validation de la technique par l'élargissement de l'échantillonnage à différentes zones géographiques	195
1.3.3.	Empreintes chimiques par ¹ H RMN des solutions	197
1.3.4.	Analyses CCM des extraits bruts de <i>Turbinaria ornata</i> et <i>T. conoides</i> de Nouvelle Calédonie (Ouiné) (démarche A)	199
1.3.5.	Séparation des classes de lipides et analyses des fractions obtenues en CCM (démarche A)	201
1.3.6.	Nouvelles Analyses CCM des extraits bruts de <i>Turbinaria ornata</i> et <i>T. conoides</i> de Nouvelle Calédonie (Ouiné) (Démarche B)	203
1.3.6.1.	Analyses CCM et RMN	213
1.3.7.	Recherche de l'acide turbinarique au sein des échantillons du genre <i>Turbinaria</i>	214
2. Etude chimiotaxonomique de <i>Bifurcaria bifurcata</i>.....		216
2.1.	Etat de l'art et problématique	216
2.2.	Matériels et Méthodes	217
2.2.1.	Démarche expérimentale	217
2.2.2.	Matériel biologique	219
2.2.3.	Extraction	221
2.2.4.	Analyses par chromatographie sur couche mince	221
2.2.5.	Analyses par RMN des solutions	221
2.2.6.	Analyses par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse	222

2.2.7.	Analyses statistiques	222
2.3.	Résultats.....	223
2.3.1.	Identification de chimiomarqueurs chez <i>Bifurcaria bifurcata</i> récoltés à la Pointe du Diable et à Porsmeur	223
2.3.1.1.	Analyses RMN et CCM des extraits bruts	223
2.3.1.2.	Analyses des spots discriminants par RMN.....	224
2.3.1.2.1.	Analyses par RMN et LC-MS du spot B de l'extrait de <i>Bifurcaria bifurcata</i> en provenance de Porsmeur (Spot B-BbPM)	226
2.3.1.2.2.	Analyses par RMN du spot B de l'extrait de <i>Bifurcaria bifurcata</i> en provenance de la Pointe du Diable (spot B-Bb-PD)	232
2.3.2.	Recherche de la limite géographique de la répartition des types chimiques	233
3.	Discussion	237
3.1.	Distinction interspécifique par l'isolement de chimiomarqueurs au sein du genre <i>Turbinaria</i>	237
3.2.	Etude chimiotaxonomique de <i>Bifurcaria bifurcata</i>	239
	Conclusion- Synthèse.....	243
	CHAPITRE IV : RECHERCHE DE COMPOSES BIOACTIFS AU SEIN DE LA FAMILLE SARGASSACEAE	245
	Introduction.....	247
1.	Matériels et méthodes	249
1.1.	Techniques de purification et d'analyses des biomolécules.....	249
1.2.	Criblage d'activités biologiques	250
1.2.1.	Matériel biologique	250
1.2.1.1.	Sargassaceae tempérées	250
1.2.1.2.	Sargassaceae tropicales.....	250
1.2.2.	Extractions	250
1.2.2.1.	Extraction de composés polaires.....	251
1.2.2.2.	Extraction de composés apolaires.....	251
1.2.3.	Tests d'activités biologiques	251
1.2.3.1.	Détermination de l'activité neurotoxique	251
1.2.3.2.	Détermination de l'activité anti-inflammatoire.....	252
1.2.3.3.	Détermination de l'activité cytotoxique.....	252
1.2.3.4.	Détermination de l'activité anti-radicalaire par la méthode du DPPH.....	253
1.2.3.5.	Détermination de l'activité anti-oxydante par la méthode du β -carotène sur microplaque.....	253
1.3.	Isolement de biomolécules actives par bio-guidage.....	253
1.3.1.	Molécules à activité anti-inflammatoire.....	253
1.3.2.	Molécules à activité anti-radicalaire	254
1.4.	Purification de biomolécules.....	256
1.4.1.	Purification de la fucoxanthine	256
1.4.2.	Tests d'activité des chimiomarqueurs identifiés	259
2.	Résultats	259
2.1.	Criblage d'activités biologiques des Sargassaceae tropicales.....	259
2.2.	Criblage d'activités biologiques des Sargassaceae tempérées	260
2.3.	Isolement de biomolécules actives par bio-guidage.....	263
2.3.1.	Isolement de molécule(s) à activité anti-inflammatoire	263

2.3.2.	Isolement de composé(s) à activité antiradicalaire.....	275
2.3.2.1.	Test DPPH sur les fractions de Bifurcaria bifurcata de la Pointe du Diable et de Porsmeur	275
2.3.2.2.	Analyses complémentaires en CCM des fractions sélectionnées.....	278
2.3.2.3.	Analyse du spot «PM- F12-3 » par RMN.....	279
2.3.2.4.	Rendement du fractionnement par bioguidage de l'extrait apolaire de Bifurcaria bifurcata	280
2.4.	Purification de la fucoxanthine	282
2.5.	Tests d'activités biologiques des molécules isolées.....	284
3.	Discussion	286
3.1.	Criblage d'activités biologiques	286
3.2.	Isolement de biomolécules actives par bio-guidage.....	290
3.2.1.	Isolement de molécules à activité anti-inflammatoire.....	290
3.2.2.	Isolement de molécules à activité anti-radicalaire.....	291
3.3.	Tests d'activités biologiques des molécules isolées.....	291
	Conclusion - Synthèse.....	292
	CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	295
	Synthèse	297
	Perspectives	299
	Conclusion générale.....	300
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	301
	REFERENCES ELECTRONIQUES.....	322
	ANNEXES	323
	NOUVEAU CHAPITRE DE LA THESE®	335

Liste des Figures

Introduction

Figure 1 : Arbre de vie montrant la position des Algues Brunes (Phaeophytes), Rouges et Vertes au sein des Eucaryotes. D'après Keeling <i>et al.</i> (2005) sur la base de phylogénies moléculaires et autres caractères moléculaires, ainsi que des données morphologiques et biochimiques.....	20
Figure 2 : Production mondiale d'algues (en tonnes de matière fraîche) et valeur de l'algoculture (en milliard de dollars US (US \$)) entre 1998 et 2007, d'après la FAO, données de 2009 [2].	23
Figure 3 : Nombres d'articles concernant la recherche et les composés issus des macroalgues marines (modifié d'après Ioannou et Roussis 2009).....	25
Figure 4 : Nombres de métabolites identifiés chez les algues vertes, brunes et rouges entre 1960 et 2008 (modifié d'après Ioannou et Roussis 2009).....	26
Figure 5 : Distribution de l'activité des métabolites identifiés chez les macroalgues marines (modifié d'après Ioannou et Roussis 2009).....	27

Chapitre I

Figure 6 : Divisions de l'environnement marin (d'après Lee 1999). HMVE : niveau moyen des hautes mers de vives eaux , BMVE : niveau moyen des basses mers de vives eaux.....	34
Figure 7 : Vue d'ensemble des zones géographiques étudiées.	35
Figure 8 : Les différentes masses d'eau bordant le littoral breton (Castric-Faey <i>et al.</i> 2001).	36
Figure 9 : Marnage moyen (m) sur les côtes bretonnes (d'après [3] in Connan 2004).	37
Figure 10 : Diagramme de l'étagement vertical de la végétation marine en zone tempérée du Nord-Est Atlantique. HMVE : niveau moyen des hautes mers de vives eaux , HMME : niveau moyen des hautes mers de mortes eaux , BMME : niveau moyen des basses mers de mortes eaux, BMVE : niveau moyen des basses mers de vives eaux , Zéro des cartes : niveau des plus basses mers (Floc'h 1964, modifié d'après Cabioc'h <i>et al.</i> , 2006).	39
Figure 11 : Régions biogéographiques de l'Atlantique Nord-Est : A : Région atlantique tempérée froide, boréo-atlantique , B : Région méditerranéo-atlantique, tempérée chaude (B1 : province lusitanienne, B2 : province méditerranéenne, B3 : province canarienne). Le maximum de biodiversité est recensé dans la zone de transition entre les deux régions (en rouge).	40
Figure 12 : Etagement vertical du peuplement des cuvettes en milieu rocheux. A et B : cuvettes des hauts niveaux de l'estran , C : mare de la mi-marée (Cabioc'h <i>et al.</i> 2006).	41
Figure 13 : Carte présentant les états et pays du Pacifique Sud. Les états dont les noms sont soulignés sont concernés par cette étude.	42
Figure 14 : Circulation océanique moyenne de surface estimée à partir des données climatologiques CARS (CSIRO Atlas of Regional Seas). SEC : Courant équatorial Sud, EAC : Courant Est Australien, SECC : Contre-courant équatorial Sud, STCC : Contre-courant sub-tropical (d'après Kessler in [5]).	43
Figure 15 : Répartition des récifs coralliens dans le monde (en rouge). Les lignes oranges délimitent les zones où la température hivernale de l'eau de mer de surface est supérieure à 20°C (d'après Hubbard 1997). Les zones étudiées au cours de ces travaux de thèse sont renseignées par des cercles verts.	44

Figure 16 : Coupe schématique du complexe récifal d'une île haute volcanique modifiée d'après Littler et Littler 1994 et Montaggioni 2005.....	46
Figure 17 : Gradient de biodiversité dans l'océan Pacifique.....	47
Figure 18 : Emplacement des deux sites d'échantillonnage en milieu tempéré : l'anse de Pormeur et la Pointe du Diable	48
Figure 19 : Schéma de la biodiversité algale dominante des sites étudiés : vue de profil des cuvettes étudiées à La Pointe du Diable (A) et à Porsmeur (B). Les principales espèces d'algues vivant dans ces deux sites sont schématisées de façon qualitative et non quantitative.	50
Figure 20 : Emplacement des zones géographiques étudiées dans le Pacifique Sud.....	51
Figure 21: Géographie des principales îles des Salomon et situation géographique des sites de prélèvement (soulignés sur la figure).....	52
Figure 22. : Géographie des principales îles néocalédoniennes et situation géographique des sites de prélèvement (soulignés).	55
Figure 23. : Géographie des principales îles des Fidji et situations géographiques des sites de prélèvement (soulignés).	56
Figure 24 : Position de la famille des Sargassaceae au sein des Phaeophyceae, d'après une reconstruction phylogénétique Bayésienne basée sur l'alignement de séquences <i>rbcL</i> représentant les ordres et familles de la classe des Phaeophyceae (d'après Phillips <i>et al.</i> 2008a). A, Ascoseirales, D, Desmarestiales, Du, Durvillaeaceae, E, Ectocarpales, F, Fuciales, i, <i>incertae sedis</i> , H, Himanthaliaceae, L, Laminariales, N, Notheiaceae, Ne, Nemodermatales, O, Onslowiales, R, Ralfsiales, S, Sargassaceae, Sc, Scytothamnales, Se, Seirococcaceae, Sp, Sporochnales, Spc, Spacelariales, Sy, Syringodermatales, T, Tilopteridales.	60
Figure 25 : A - Récolte de <i>Sargassum fusiforme</i> (initialement connue sous le nom d' <i>Hizikia fusiformis</i>) pour la consommation humaine au Japon (Sotogawa-cho, Choshi, Chiba Prefecture). Photographe Hideki Haga (Guiry et Guiry 2009). B – Conditionnement de <i>Sargassum fusiforme</i> vendu sous le nom d'Hiziki.	62
Figure 26 : (A)-Acide sargaquinoïque isolé de <i>Sargassum macrocarpum</i> (B)-Plastoquinone isolée de <i>Sargassum micracanthum</i> et ayant une action antivirale contre le cytomegalovirus et le virus de la rougeole (Mayer et al, 2009) (C)- Sargochromol isolé de <i>Sargassum macrocarpum</i> et ayant un effet neuroprotecteur sur les cellules nerveuses PC12D (Mayer <i>et al.</i> 2009).....	62
Figure 27 : Cycle de développement des espèces monoïques appartenant à la famille Sargassaceae (cycle monogénétique diplophasique) d'après Stiger (1997) et De Revers (2006). Les espèces dioïques présenteront des individus mâles et femelles séparés.....	63
Figure 28 : Répartition mondiale des 4 genres de Sargassaceae étudiés : <i>Bifurcaria</i> , <i>Cystoseira</i> , <i>Sargassum</i> et <i>Turbinaria</i> (reconstituée d'après Guiry et Guiry 2009).....	65
Figure 29 : Photographies des 3 espèces de Sargassaceae étudiées en Bretagne	68
Figure 30 : Extension au cours du temps de la distribution de <i>Sargassum muticum</i> le long des côtes atlantiques et méditerranéennes d'Europe, de 1970 à nos jours (d'après Mineur F., données non publiées).....	69
Figure 31 : Morphologie générale d'un thalle de <i>Sargassum muticum</i> . A : thalle immature constitué d'un axe principal court (a) et d'une latérale présentant des flotteurs (l) (d'après Copejans 1995) B : fragment de latérale présentant des réceptacles (r) et des flotteurs (f).....	70
Figure 32 : Morphologie d'un thalle de <i>Cystoseira baccata</i> . A : à Penmarch (d'après Jegou, comm. pers.), B : à la Pointe du Diable, C : Détail de l'apex d'un rameau de <i>C. baccata</i> présentant des réceptacles matures (r). Les points plus clairs sont les conceptacles hermaphrodites remplis de gamètes (c).....	71
Figure 33 : Morphologie générale d'un thalle de <i>Bifurcaria bifurcata</i> . A : Thalle présentant un faux rhizome (Rh) et des latérales portant en apex des réceptacles (r), B : Détail de l'apex d'une latérale de <i>B. bifurcata</i> présentant des réceptacles matures (r). Les points plus clairs sont les conceptacles hermaphrodites (c) remplis de gamètes.....	73

Figure 34 : Positionnement des espèces de <i>Sargassum</i> (S.) et <i>Turbinaria</i> (T.) étudiées dans le Pacifique Sud, en fonction des zones géographiques et du gradient de biodiversité (flèche orange).....	74
Figure 35 : Morphologie générale de <i>Sargassum polycystum</i> C. Agardh, d'après l'herbier IRD1572 (morphotype SB). (A), de <i>Sargassum cristaefolium</i> C. Agardh, d'après l'herbier IRD1564 (morphotype CSA) (B) et de <i>Sargassum aquifolium</i> J. Agardh, d'après l'herbier IRD1558 (morphotype DLM) (C). Échelle 3 cm (d'après Mattio 2008). .	75
Figure 36 : Description morphologique des espèces de <i>Turbinaria conoides</i> , <i>T. decurrens</i> et <i>T. ornata</i> (d'après Taylor 1964, Stiger 1997 et Rohfritsch 2006). A : aspect général du thalle d'après <i>T. ornata</i> (AP : axe principal , C : cicatrice , Cr : cryptostomate, DB : disque basal , , r : repousse , S : stolons) et B : Description morphologique des pleuridies des espèces présentes dans cette étude.....	77

Chapitre II

Figure 37: Structures chimiques illustrant les 6 classes de Phlorotannins retrouvés chez les Phaeophyceae avec mention de l'espèce où a été isolé le composé. Les Phlorotannins sont classés en fonction de la structure du polymère de phloroglucinol (d'après Ragan et Glombitza 1986, Amsler et Fairhead 2006, Kornprobst 2006, Singh et Bharate 2006).....	82
Figure 38 : Structure chimique de la fucoxanthine.....	85
Figure 39 : Protocole utilisé pour étudier l'effet du conditionnement des algues sur les teneurs en composés phénoliques et les activités antiradicalaires et antioxydantes associées.	88
Figure 40 : Protocole de dosage des composés phénoliques selon la méthode de Folin-Ciocalteu d'après Connan (2004)	92
Figure 41 : Chromatogramme caractéristique d'un échantillon pigmentaire (méthanol : eau ultra pure (85:15 , v:v) tamponné avec du CH ₃ COON (concentration finale : 0,5 M)) de Sargassaceae (ici <i>Sargassum muticum</i> récoltée en avril 2008 à la Pointe du Diable). Le pic caractéristique de la fucoxanthine est indiqué par une flèche.	93
Figure 42 : Boudins de dialyse suspendus (photographie de gauche) et plongés dans un grand volume d'eau déionisée (photographie de droite).	97
Figure 43: Protocole de séparation des classes de taille des composés phénoliques.....	98
Figure 44: Evolution saisonnière des mares étudiées à la Pointe du Diable (A) et à Porsmeur (B), vue de profil. Ne sont représentées que les espèces étudiées : <i>S. muticum</i> , <i>C. baccata</i> et <i>B. bifurcata</i>	134
Figure 45 : Classes de taille des composés phénoliques exprimées en pourcentage pour <i>Cystoseira baccata</i> , <i>Bifurcaria bifurcata</i> et <i>Sargassum muticum</i> en fonction des sites. A : Pointe de Diable et B : Anse de Porsmeur en hiver et en été 2007. (Da : Dalton).	136
Figure 46: Variations spatio-temporelles des teneurs en fucoxanthine chez <i>Sargassum muticum</i> (■), <i>Cystoseira baccata</i> (■) et <i>Bifurcaria bifurcata</i> (■), MS : matière sèche. Les lettres indiquent les différences significatives (Anova : p < 0,001, test HSD).	138
Figure 47 : Photographie de résultat du test DPPH sur plaque CCM permettant d'estimer l'activité antiradicalaire des extraits pigmentaires des Sargassaceae tempérées. Un extrait est considéré comme actif lorsqu'un halo blanchâtre se forme autour du dépôt.	140
Figure 48 : Classes de taille des composés phénoliques exprimées en pourcentage pour les genres <i>Sargassum</i> et <i>Turbinaria</i> en provenance du Pacifique Sud en fonction de A : l'origine géographique des échantillons (îles Salomon, Nouvelle Calédonie ou îles Fidji), B : la profondeur du site de prélèvement (0 à 1 m : surface , 1 à 3 m : intermédiaire et 3 à 6 m : profond) et C : la géomorphologie des sites de prélèvement (Da : dalton).	163
Figure 49 : Variations des teneurs en fucoxanthine de Sargassaceae tropicales en fonction du genre, de l'archipel (A), de la profondeur (B) et de la géomorphologie (C) du site de prélèvement. Surface : de 0 à 1 m , Intermédiaire : de 1	

à 3 m et Profond : de 3 à 6 m de profondeur. Les lettres indiquent les différences significatives (Anova : $p < 0,001$, Test HSD). MS : matière sèche.	165
Figure 50 : Photographie des résultats d'un test DPPH sur plaque CCM permettant d'estimer l'activité antiradicalaire des extraits pigmentaires des Sargassaceae tropicales. Un extrait est considéré comme actif lorsqu'un halo blanchâtre se forme autour du dépôt (rond vert).....	166

Chapitre III

Figure 51 : Arbre phylogénétique construit avec la méthode du plus proche voisin à partir des matrices de distances Kimura à deux paramètres des séquences concaténées <i>Rubisco</i> , <i>trnWetnI</i> , <i>TufA</i> et <i>ITS-2</i> . Les valeurs numériques des nœuds indiquent les scores de bootstraps supérieurs à 50%. Outgroup : témoin extérieur. FP, Polynésie Française, SA, Archipel de la Société, TA, Archipel des Tuamotu (d'après Rohfritsch <i>et al.</i> 2007).	181
Figure 52 : Principales étapes de la démarche expérimentale menée lors de l'isolement de chimiomarqueurs au sein du genre <i>Turbinaria</i> . LN : lipides neutres, GL : galactolipides et dérivés, PL : phospholipides et dérivés.	183
Figure 53 : Synoptique du protocole de séparation des classes de lipides sur micro-colonne ouverte de silice (d'après Christie 2003).	187
Figure 54 : Spectres ^1H RMN HR-MAS des 8 échantillons du genre <i>Turbinaria</i> récoltés au sein du Pacifique Sud. Tous les spectres ont été alignés sur le signal du mannitol (M). IS : îles Salomon, API : Anuta Paina Island, NC : Nouvelle Calédonie. Les signaux discriminants les plus facilement identifiables sont entourés en orange.	195
Figure 55 : Analyse en composantes principales effectuée à partir des données ^1H RMN HR-MAS des 8 échantillons du genre <i>Turbinaria</i> récoltés au sein du Pacifique Sud. To : <i>Turbinaria ornata</i> , Tc : <i>Turbinaria conoides</i> , IS : îles Salomon, API : Anuta Paina Island, LL : Lau Lagoon, NC : Nouvelle Calédonie, IF : îles Fidji.....	196
Figure 56 : Spectres ^1H -RMN des extraits apolaires de <i>Turbinaria conoides</i> (A) et de <i>T. ornata</i> (B). Les signaux discriminants sont marqués par une étoile et sont colorés en rouge chez <i>T. conoides</i> et en bleu chez <i>T. ornata</i> ...	198
Figure 57 : Schéma des résultats obtenus en chromatographie sur couche mince selon le protocole I. DCF : dichlorofluoresceine, Ortho : Acide orthophosphorique & sulfate du cuivre, diphényl : Diphenylamine, Orcinol : Orcinol. Les flèches et les cercles indiquent les composés intéressants et considérés comme chimiomarqueurs de <i>T. conoides</i> . Les échantillons de <i>T. conoides</i> et <i>T. ornata</i> proviennent de Nouvelle Calédonie (Ouiné).	199
Figure 58 : Schéma des résultats obtenus en chromatographie sur couche mince en 2 dimensions pour <i>Turbinaria conoides</i> (A) et <i>T. ornata</i> (B) de Nouvelle Calédonie (Ouiné). Systèmes de révélation : DCF : dichlorofluoresceine, Ortho : Acide orthophosphorique & sulfate de cuivre, diphényl : Diphenylamine, Orcinol : Orcinol. Le spot permettant de distinguer l'extrait de <i>T. conoides</i> de celui de <i>T. ornata</i> est entouré en orange....	200
Figure 59 : Spectres RMN des fractions LN (Lipides Neutres) des extraits apolaires de <i>Turbinaria conoides</i> (A) et <i>T. ornata</i> (B) de Nouvelle Calédonie (Ouiné). Les flèches indiquent les signaux distinctifs, les signaux en couleurs indiquent des zones présentant des différences discriminantes.	201
Figure 60 : Résultats obtenus en CCM selon le protocole I des extraits bruts et des fractions de <i>Turbinaria conoides</i> (A) et <i>T. ornata</i> (B) de Nouvelle Calédonie (Ouiné). LN : Lipides Neutres, GL : Glycolipides et PL : Phospholipides. Les spots des fractions LN entourés présentent des glycolipides révélés à l'orcinol (icône●) et à la diphenylamine (icône■).	202
Figure 61 : Comparaison de la migration d'extraits de <i>Turbinaria conoides</i> (Tc) et de <i>T. ornata</i> (To) de Nouvelle Calédonie (Ouiné) en CCM selon le protocole I (A) et le protocole II(B) (cf. §1.2.5 - Analyses des extraits lipidiques en chromatographie sur couche mince, p.185).	213
Figure 62 : Spectres ^1H -RMN des spots discriminants obtenus par Chromatographie sur Couche Mince selon le protocole II à partir des extraits bruts de <i>Turbinaria conoides</i> (Tc, A) et de <i>T. ornata</i> (To, B) de Nouvelle Calédonie (Ouiné). Les flèches indiquent les signaux discriminants.	214

Figure 63 : Spectres RMN HR-MAS des 11 échantillons du genre <i>Turbinaria</i> récoltés au sein du Pacifique Sud. Tous les spectres ont été alignés sur le signal du CDCl_3 . Les flèches indiquent les déplacements chimiques caractéristiques de l'acide turbinarique. IS : îles Salomon, API : Anuta Paina Island, LL : Lau Lagoon, NC : Nouvelle Calédonie.	215
Figure 64 : Composés diterpénoides caractéristiques des types chimiques 1 (Eléganolone) et 2 (Bifurcane) de <i>Bifurcaria bifurcata</i> (d'après Valls <i>et al.</i> 1995).	216
Figure 65. Répartition géographique des types chimiques 1 et 2 présents dans différentes populations de <i>Bifurcaria bifurcata</i> le long des côtes bretonnes, avec les étoiles représentant les sites de récoltes de l'étude de Valls <i>et al.</i> (1995).	217
Figure 66 : Principales étapes de la démarche expérimentale menée lors de l'identification des chimiomarqueurs de <i>Bifurcaria bifurcata</i> (A) et de la recherche de la limite de répartition géographique et du facteur environnemental responsable de la répartition des types chimiques (B).	218
Figure 67 : Emplacement géographique des sites de récolte des échantillons de <i>Bifurcaria bifurcata</i> le long des côtes du Finistère et du Morbihan en Juillet 2009 (image Google Earth).	220
Figure 68 : Protocole de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) (d'après le protocole utilisé dans le projet ECIMAR) utilisé lors de l'analyse des spots discriminants de <i>Bifurcaria bifurcata</i> récoltée à Porsmeur et à la Pointe du Diable.	222
Figure 69 : Spectres ^1H RMN des extraits terpéniques de <i>Bifurcaria bifurcata</i> récoltée en Décembre 2006 à Porsmeur (A) et à la Pointe du Diable (B). Les étoiles signalent les zones différentes entre les deux spectres.	223
Figure 70 : Analyse par CCM des extraits bruts terpéniques issus de <i>Bifurcaria bifurcata</i> récoltée en Décembre 2006 à la Pointe du Diable et à Porsmeur.	224
Figure 71 : Résultats de l'analyse ^1H RMN du spot discriminant retenu (spot dont le $R_f = 0,62$) chez <i>Bifurcaria bifurcata</i> récoltée à la pointe du diable (Bb PD) et à Porsmeur (Bb PM)	225
Figure 72 : Spectre ^1H RMN du spot B de l'extrait dichlorométhane:méthanol (2:1, v:v) de <i>Bifurcaria bifurcata</i> récoltée en décembre 2006 à Porsmeur. Les attributions des signaux caractéristiques du composé majoritaire (la bifurcanone) sont représentées en couleur, d'après Hougaard <i>et al.</i> (1991).	226
Figure 73 : Spectre ^{13}C RMN du spot B de l'extrait dichlorométhane:méthanol (2:1, v:v) de <i>Bifurcaria bifurcata</i> récoltée en décembre 2006 à Porsmeur. Les attributions des signaux caractéristiques du composé majoritaire (la bifurcanone) sont représentées en couleur, d'après Hougaard <i>et al.</i> (1991).	227
Figure 74 : Chromatogramme obtenu par analyse LC-MS du spot B-BbPM de l'extrait dichlorométhane:méthanol (2:1, v:v) de <i>Bifurcaria bifurcata</i> récoltée en décembre 2006 à Porsmeur	229
Figure 75 : Chromatogramme de masse du composé majoritaire du spot B-BbPM de l'extrait dichlorométhane:méthanol (2:1, v:v) de <i>Bifurcaria bifurcata</i> récoltée en décembre 2006 à Porsmeur.	230
Figure 76 : Chromatogramme UV à 195 nm du spot B BbPM de l'extrait dichlorométhane:méthanol (2:1, v:v) de <i>Bifurcaria bifurcata</i> récoltée en décembre 2006 à Porsmeur.	231
Figure 77 : Chromatogramme UV à 254 nm du spot B BbPM de l'extrait dichlorométhane:méthanol (2:1, v:v) de <i>Bifurcaria bifurcata</i> récoltée en décembre 2006 à Porsmeur	232
Figure 79 : Spectre ^1H RMN du spot B de l'extrait dichlorométhane:méthanol (2:1, v:v) de <i>Bifurcaria bifurcata</i> récoltée en décembre 2006 à la Pointe du Diable.	233
Figure 80 : Analyse par CCM des extraits terpéniques obtenus à partir d'échantillons de <i>Bifurcaria bifurcata</i> récoltés le long des côtes de la Pointe Bretagne (cf. Figure 67 pour la localisation des différents sites visités).	234
Figure 81 : Analyse en composante principale effectuée sur les profils CCM des extraits terpéniques des échantillons de <i>Bifurcaria bifurcata</i> récoltés autour de la pointe bretonne, de Fort Bloqué à Portsall (cf. Figure 67 pour la localisation des différents sites).	235
Figure 82 : Structure chimique de l'éléganediol (d'après Culioli <i>et al.</i> 2002).	241

Chapitre IV

Figure 83 : Variations saisonnières de l'éléganediol, de l'éléganolone et de la bifurcane en mg/g de matière sèche (MS) chez <i>Bifurcaria bifurcata</i> récoltée à Roscoff entre juillet 1998 et juin 1999, modifié d'après Culioli <i>et al.</i> (2002).	242
Figure 84 : Schéma synthétique des travaux de purification des extraits anti-inflammatoires de Sargassaceae tropicales	254
Figure 85 : Schéma synthétique des travaux de purification entrepris sur les extraits apolaires de <i>Bifurcaria bifurcata</i> en provenance de la Pointe du Diable (A) et de Porsmeur (B) et présentant une activité anti-radicalaire.	255
Figure 86 : Protocole de purification de la fucoxanthine, PD : Pointe du Diable.	257
Figure 87 : Bioguidage concernant les extraits apolaires de <i>Sargassum aquifolium</i> (A) et de <i>Turbinaria conoides</i> (B) récoltées aux îles Salomon (Anuta Paina Island) et présentant une activité anti-inflammatoire. PLA ₂ : phospholipase A ₂ .	264
Figure 88 : Schéma synthétique des travaux de purification entrepris sur les extraits apolaires de <i>Bifurcaria bifurcata</i> en provenance de la Pointe du Diable (A) et de Porsmeur (B) et présentant une activité anti-radicalaire.	276
Figure 89 : Activité antiradicalaire des extraits bruts apolaires de <i>Bifurcaria bifurcata</i> de la Pointe du Diable (A) et de Porsmeur (B) et des fractions obtenues via le fractionnement de ces extraits par flash chromatographie sur cartouche de C18. Le BHA a été utilisé comme témoin positif. Les flèches indiquent les fractions les plus actives retenues pour analyse complémentaire en CCM. EB : Extrait brut.	277
Figure 90 : Schéma de la plaque CCM après migration et révélation au DPPH. La flèche indique le spot sélectionné pour des analyses structurales en RMN (spot F12-3).	278
Figure 91 : Spectre RMN ¹ H (Bruker, 500 MHz) de la fraction PM-F12-3 de l'extrait dichlorométhane:méthanol (2:1, v:v) de <i>Bifurcaria bifurcata</i> . Les attributions des pics caractéristiques de l'éléganolone sont représentés (d'après Culioli <i>et al.</i> 1999a).	279
Figure 92 : Spectre RMN ¹³ C (Bruker, 125 MHz) de la fraction PM-F12-3 de l'extrait dichlorométhane:méthanol (2:1, v:v) de <i>Bifurcaria bifurcata</i> . Les attributions des pics caractéristiques de l'éléganolone sont représentés (d'après Culioli <i>et al.</i> 1999a).	280
Figure 93 : Fractionnement par bioguidage de l'extrait apolaire de <i>Bifurcaria bifurcata</i> (récolté à Porsmeur en avril 2008) ayant abouti à l'identification de l'éléganolone, composé antiradicalaire. MS : matière sèche algale.	281
Figure 94 : Chromatogramme illustrant les résultats de la dernière étape de la purification de la fucoxanthine.	282
Figure 95 : Structure chimique de la fucoxanthine (all <i>trans</i> -fucoxanthine) (d'après Yan <i>et al.</i> 1999).	282
Figure 96 : Activités antiradicalaire (A) et antioxydante (B) de la fucoxanthine, de l'éléganolone et des antioxydants de synthèse (BHA, BHT, Vit C et Vit E).	285

Liste des Tableaux

Chapitre I

Tableau 1 : Description des sites de prélèvement aux îles Salomon.	53
Tableau 2 : Description des sites de prélèvement situés sur la Grande Terre en Nouvelle Calédonie	55
Tableau 3 : Description des sites de prélèvement aux îles Fidji	57
Tableau 4 : Classification des Sargassaceae dans l'arbre de la vie (d'après De Reviers 2003a, De Reviers 2003b, Cavalier-Smith 2004, Phillips <i>et al.</i> 2008a, Phillips <i>et al.</i> 2008b, Guiry et Guiry 2009).	59

Chapitre II

Tableau 5 : Etude bibliographique des rôles écologiques présumés des composés phénoliques chez les Phaeophyceae (d'après Amsler et Fairhead 2006).	83
Tableau 6 : Sources de variations des teneurs en composés phénoliques retrouvées dans la littérature.	84
Tableau 7 : Nombre de quadrats utilisés par site pour chacune des espèces étudiées.	90
Tableau 8 : Espèces récoltées au sein de chaque archipel en fonction des sites de prélèvement.	91
Tableau 9 : Valeurs maximales (en gras) et minimales des teneurs en fucoxanthine pour <i>Sargassum muticum</i> , <i>Cystoseira baccata</i> et <i>Bifurcaria bifurcata</i> , MS : matière sèche.	139
Tableau 10 : Résultats des corrélations de Pearson testées entre les teneurs en fucoxanthine et l'intensité lumineuse (PAR) pour chaque espèces étudiées.	140

Chapitre III

Tableau 11: Protocoles de chromatographie sur couche mince utilisés dans l'analyse d'extraits bruts et de fractions lors de l'indentification de chimiomarqueurs de <i>Turbinaria ornata</i> et <i>T. conoides</i>	186
Tableau 12 : Critères retenus pour la distinction des espèces de <i>Turbinaria</i> par HRMAS. En gras sont signalés les signaux les plus discriminants retenus pour la suite de l'étude.	197
Tableau 13 : Sites de prélèvement visités afin de récolter des échantillons de <i>Bifurcaria bifurcata</i> le long des côtes du Finistère et du Morbihan (du Nord au Sud).	219
Tableau 14 : Données des spectres RMN du proton (¹ H-RMN) et du carbone (¹³ C-RMN) et attributions des signaux obtenus lors de cette étude et décrites également par Hougaard <i>et al.</i> (1991) pour comparaison	228
Tableau 15 : Présentations des 6 écotypes chimiques retrouvés chez <i>Bifurcaria bifurcata</i> et distribués le long des côtes bretonnes, du Finistère au Morbihan.	236
Tableau 16 : Groupes chimiques des espèces du genre <i>Cystoseira</i> ayant un caractère chimiotaxonomique.	238

Chapitre IV

Tableau 17 : Exemples d'activités biologiques rencontrées au sein des Sargassaceae et principalement du genre <i>Sargassum</i>	248
Tableau 18 : Récapitulatif des fractions contenant les chimiomarqueurs identifiés au Chapitre III (en gras) et testées en activités antiradicalaire, antioxydant et anti-inflammatoire ainsi qu'en cytotoxicité et en neurotoxicité.	259
Tableau 19 : Criblage d'activités effectué sur les extraits polaires (hydrométhanolique) et sur les extraits apolaires (dichlorométhane:méthanol) de la majorité des échantillons algaux de milieu tropical. nd : non déterminée ; - : pas d'activité détectée ; HA : hyper activité des larves de diptères.	261
Tableau 20 : Criblage d'activités effectué sur les extraits polaires (hydrométhanolique) et sur les extraits apolaires (dichlorométhane : méthanol) de la majorité des échantillons algaux de milieu tempéré. nd : non déterminée ; - : pas d'activité détectée.....	262
Tableau 21 : Données des spectres RMN du proton (^1H -RMN) et du carbone (^{13}C -RMN) et attributions des signaux (d'après Haugan <i>et al.</i> 1992, Yan <i>et al.</i> 1999).....	283
Tableau 22 : Résultats des tests d'activité concernant les molécules isolées chez les différentes espèces étudiées.	284
Tableau 23 : Liste non exhaustive d'extraits de macroalgues présentant des activités anti-inflammatoire, cytotoxique et neurotoxique. Les espèces de Sargassaceae sont indiquées en gras.	287
Tableau 24 : Liste non exhaustive de composés issus de macroalgues et présentant des activités anti-inflammatoire, cytotoxique ou neurotoxique. Concernant l'activité cytotoxique, seuls les composés issus de Phaeophyceae ont été pris en compte dans un souci de clarté. En gras sont indiqués les espèces de Sargassaceae et leurs composés actifs.	289
Tableau 25 : Résumé des étapes de Recherche & Développement pour la mise sur le marché d'un nouveau médicament (d'après Di Masi <i>et al.</i> 1995, Kornprobst 2005). Le cadre orange repositionne notre étude dans le contexte d'un programme de Recherche & Développement d'un principe actif.	293

Avant-propos

Contexte institutionnel

Les travaux de recherche conduisant à cette thèse ont été effectués au Laboratoire d'Ecophysiologie et de Biotechnologie des Halophytes et des Algues Marines (LEBHAM, EA 3877), laboratoire basé à l'Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM) à Plouzané. L'IUEM est une composante de l'Université de Bretagne Occidentale (UBO), elle-même rattachée à l'Université Européenne de Bretagne (UEB). L'école doctorale de rattachement est l'Ecole Doctorale de Sciences de la Mer (EDSM, ED n° 156). Cette thèse a été menée sous la direction de Valérie Stiger-Pouvreau (Maître de conférences à l'UBO). Les travaux de recherche ont été suivis par un comité de thèse composé de Claude Payri (Professeur des Universités, en détachement à l'IRD de Nouméa), Nelly Kervarec (Ingénieur d'Etude au service commun de RMN-RPE de l'UBO), Edouard Kraffe (maître de conférences à l'UMR 6521, CNRS, UBO) et Stéphane Labarre (Chargé de Recherche, UMR 7139, CNRS, Roscoff). L'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) de Nouméa a assuré la totalité des campagnes de récolte dans le Pacifique Sud ainsi que le conditionnement (notamment la lyophilisation des échantillons) et l'envoi du matériel biologique en Métropole, sous la responsabilité du Pr. Claude Payri. Le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MESR) a assuré le versement d'une allocation de recherche mensuelle d'octobre 2006 à septembre 2009. Le programme CRISP (Coral Reef Initiative for South Pacific) a assuré une partie du financement (fonctionnement, équipement).

Formations & Congrès

Au cours de ces 3 années de thèse, j'ai assisté à plusieurs formations dispensées par l'EDSM, dont une formation en management et communication interpersonnelle qui m'a permis de mieux appréhender le travail en équipe. J'ai également participé au « Nouveau Chapitre de la Thèse[®] », formation professionnalisante visant la valorisation des compétences, organisé l'Association Bernard Grégory (ABG) et prise en charge par l'EDSM. En juin 2008, j'ai effectué un séjour d'un mois au laboratoire MAPIEM (Matériaux Polymères Interface et Environnement Marin, EA 4323) au sein de l'équipe *Biofouling et Substances Naturelles Marines* de l'Université du Sud Toulon-Var. Au cours de ce stage, je me suis formée à l'isolement de biomolécules et à l'utilisation de divers systèmes de chromatographies (Flash chromatographie, chromatographie préparative et chromatographie liquide couplée à un spectroscope de

masse). Dans le cadre de ma thèse, j'ai participé aux Journées Phycologiques de France, à Paris, en décembre 2006 (communication par voie d'affiche), au 5th European Congress of Marine Natural Products (ECNMP) à Ischia (Italie) en septembre 2007 (communication par voie d'affiche), aux Doctoriales[®] 2008 à Brest (communication par voie d'affiche) et au 9th International Phycological Congress (IPC) de Tokyo (Japon) en août 2009 (communication orale).

Missions

Au cours de cette thèse, j'ai effectué plusieurs missions sur le terrain. Ces missions ont constitué à suivre plusieurs populations d'algues sur le littoral breton. La majorité de ces missions s'est déroulée mensuellement entre octobre 2006 et mai 2008 et a constitué le suivi écologique mené durant ma thèse.

Activités de promulgation de la recherche

J'ai participé à plusieurs activités de promulgation de la recherche telles que les journées portes ouvertes de l'IUEM (2007 et 2009) et de l'UBO (2008), au salon AZIMUT (2007), au village des Sciences de Brest 2008 et au Forum des Doctorants (2009). Au court de ce forum (organisé par l'association MERSCIDOC, association des doctorants de l'EDSM), j'ai présenté, via une communication orale, mes travaux de recherche à des lycéens.

Organisation du manuscrit

Ce manuscrit comprend une introduction générale, 4 Chapitres présentant et discutant les résultats obtenus, une conclusion générale et perspectives suivie des références bibliographiques et des annexes. Certains de ces résultats seront présentés sous la forme de manuscrits (rédigés en langue anglaise) publiés, en review ou à soumettre. Les références électroniques sont citées dans le texte sous forme de numéros entre crochet. Une liste de ces références électroniques se situe après la bibliographie. Le manuscrit se termine par le document produit lors du « Nouveau Chapitre de la Thèse[®] » et présentant une analyse critique de la manière dont j'ai conduit et géré ma thèse en tant que projet.

INTRODUCTION GENERALE

Que l'on plonge dans les eaux tempérées de l'Atlantique ou dans les mers plus chaudes des lagons tropicaux, ce qui fascine le plongeur, c'est la diversité de forme et de couleur de la vie sous-marine. Cette richesse est illustrée bien sûr par les nombreuses espèces de poissons et la multitude des animaux fixés, mais aussi par les macroalgues qui peuvent former de véritables forêts sous-marines abritant une faune que le plongeur aime découvrir et surprendre.

Les forêts de macroalgues les plus connues du grand public et des plongeurs sont bien évidemment les forêts de Laminaires et/ou de kelps. Néanmoins, il existe une famille d'algues brunes : les Sargassaceae, qui forme elle aussi des algues en milieu tempéré comme en milieu tropical.

Ce sont ces algues brunes, moins connues que d'autres, mais tout aussi essentiellement au bon fonctionnement des écosystèmes, qui ont retenu mon attention de plongeuse et de scientifique. J'ai donc décidé d'y consacrer mes recherches de thèse.

Dans cette introduction, après une brève définition des Sargassaceae et la présentation de leur position au sein de l'arbre des êtres vivants, la notion de Biodiversité sera introduite. Puis nous présenterons les voies de valorisations des macroalgues par les industriels. Enfin, nous conclurons cette introduction générale en donnant le contexte et les objectifs de ce travail de thèse.

Position de la famille des Sargassaceae dans l'arbre du vivant

La famille **Sargassaceae** est un groupe taxonomique, décrit en 1843 par Kützinger et qui appartient aux **Phaeophyceae**, mieux connus sous le nom d'« algues brunes ». Les Phaeophyceae sont des organismes strictement aquatiques et photosynthétiques se définissant par un ensemble de caractères communs tels que la structure des plastes, des cellules reproductrices flagellées et la présence de pigments de couleur jaune-orangé : les xanthophylles (dont la fucoxanthine) et les carotènes (dont le β -carotène), en plus de celle de pigments verts : les chlorophylles *a* et *c*. L'abondance des xanthophylles et des carotènes au sein de ces organismes masque les chlorophylles et donne aux Phaeophyceae leur couleur brune caractéristique (De Reviers 2003a).

Ainsi, de part leur capacité photosynthétique, leur habitat aquatique et leur couleur brune, les Phaeophyceae ont été appelées « algues brunes ». En effet, l'ensemble des organismes inféodés aux milieux aquatiques, possédant de la chlorophylle *a* et donc généralement photosynthétique, sont désignés communément sous le terme générique d'« algues » et classés selon leur couleur. On retrouve ainsi les algues brunes (ou Phaeophyceae), les algues rouges (ou Rhodophyceae) et les algues vertes (ou Chlorophyceae) (De Reviers 2003a, Cabioc'h *et al.* 2006).

Néanmoins, les algues ne forment pas un groupe taxonomique homogène. De récentes études ont montré que les organismes traditionnellement appelés algues rouges et algues vertes appartiennent au super-groupe des Plantae (tout comme les végétaux terrestres) (Keeling *et al.* 2005) (Figure 1). Les Phaeophyceae sont plus éloignés dans la radiation des Eucaryotes et constituent un ensemble monophylétique classé dans le règne des Chromista (Figure 1).

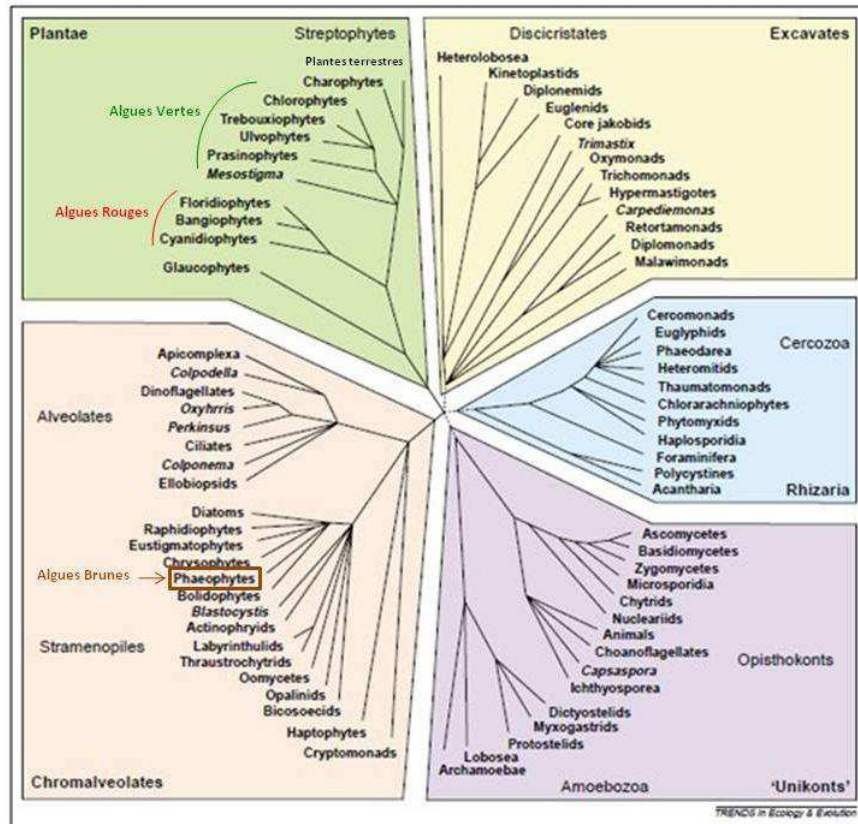


Figure 1 : Arbre de vie montrant la position des Algues Brunes (Phaeophytes), Rouges et Vertes au sein des Eucaryotes. D'après Keeling *et al.* (2005) sur la base de phylogénies moléculaires et autres caractères moléculaires, ainsi que des données morphologiques et biochimiques.

Ainsi, le terme « algues », n'étant pas représenté par un taxon unique, n'a aucun sens d'un point de vue phylogénétique et systématique (De Reviers 2003a). Néanmoins, ce terme est communément employé aussi bien par le grand public que par les scientifiques (De Reviers 2003a) pour des raisons évidentes de compréhension. C'est pourquoi, dans ce travail de thèse, les Sargassaceae, organismes photosynthétiques, pluricellulaires, macroscopiques à l'âge adulte, de couleur brune, benthiques et marines seront désignées indifféremment sous les termes génériques de macroalgues marines, macroalgues brunes ou algues brunes.

La Biodiversité : une notion complexe

Le terme de **biodiversité** est issu du terme anglais « biodiversity », contraction de l'expression « biological diversity », c'est-à-dire diversité biologique en français. Ce terme est apparu dans la littérature scientifique vers le milieu des années 1980 (Ghilarov 1996) puis s'est répandu dans le grand public à partir de la conférence des Nations Unies pour l'Environnement et le Développement, appelée aussi **Sommet de la Terre, de Rio de Janeiro (Brésil) en juin 1992**. Lors de cette conférence internationale, la Convention sur la Diversité Biologique a été ouverte à signature. L'article 2 de cette convention définit la diversité biologique comme étant la « variabilité des organismes vivants de toute origine y compris, entre autres, les écosystèmes terrestres, marins et autres écosystèmes aquatiques et les complexes écologiques dont ils font partie, cela comprend la diversité au sein des espèces et entre espèces ainsi que celle des écosystèmes » [1]. Ainsi, la biodiversité prend en compte la complexité des interactions dynamiques qui existent au sein des organismes, des espèces et des écosystèmes, du plus petit à la biosphère dans sa globalité. Il existe donc plusieurs niveaux de compréhension de la biodiversité : au niveau des écosystèmes, au niveau des espèces, au niveau des gènes et au niveau des métabolites.

La biodiversité au niveau des écosystèmes, ou **diversité écosystémique**, est généralement comprise comme l'étude des variations spatio-temporelles des écosystèmes, c'est-à-dire des relations qui existent entre les organismes vivants dans un ou plusieurs milieux. La biodiversité au niveau des espèces, ou **diversité spécifique**, est la plus communément admise et comprise. Elle représente la richesse spécifique ou le nombre d'espèces qui vivent dans un milieu donné. La biodiversité au niveau des gènes, ou **diversité génétique**, est comprise au niveau de l'espèce et/ou des populations, elle illustre l'adaptation des organismes à leur environnement et donc l'évolution des espèces. Enfin, la biodiversité peut également être comprise au niveau chimique : on parle alors de **diversité chimique** ou **chimiodiversité**. Cette diversité est comprise au niveau de l'espèce, des populations, et/ou des individus. Tout comme la diversité génétique, elle illustre l'adaptation des organismes à leur environnement par la synthèse de **métabolites particuliers**.

Ces métabolites présentent une variabilité considérable suivant leur rôle dans les organismes. Ils sont connus pour être variables dans le temps et dans l'espace et seront donc fonction des facteurs biotiques et abiotiques. De plus, certains métabolites sont spécifiques à certains taxons ou espèces voire à certaines variétés données. Ces composés sont alors qualifiés de biomarqueurs ou **chimiomarqueurs** et illustrent la diversité des êtres vivants (Pietra *et al.* 2002). Les organismes peuvent ainsi être classés suivant le type de molécules qu'ils synthétisent et on parle alors de **chimiotaxonomie**. L'étude des relations entre la composition chimique des organismes, en particulierité celle des plantes, et la classification phylogénique ou la taxonomie de ces mêmes organismes a débuté au début du 20^{ième} siècle pour prendre son essor dans les

années 1930 (Sharma 1993). En effet, dans les années 1930, McNair met en évidence une distribution taxonomique des composés lipidiques chez les plantes supérieures (McNair 1929, McNair 1930). Puis dans les années 1935, cet auteur, d'une part montre que la composition chimique des plantes supérieures varie en accord avec leur stade d'évolution (McNair 1934) et d'autre part considère la phylogénie des Angiospermes au regard de leurs compositions biochimiques (McNair 1935). Depuis, la chimiotaxonomie a été utilisée à tous les niveaux de hiérarchie de la classification, du rang de « variété » à celui de « division » et sur tous les groupes d'organismes, du plus simple au plus évolué (Sharma 1993). Les principaux composés utilisés en chimiotaxonomie chez les végétaux sont les alcaloïdes, les flavonoïdes, **les caroténoïdes**, les polysaccharides, **les terpénoïdes**, **les acides gras** et dérivés, les acides aminés et les composés aromatiques (Sharma 1993). La chimiotaxonomie, appelée aussi en anglais « chemosystematic » ou « chemical taxonomy », ne remplace pas les critères morphologiques, anatomiques, histologiques et/ou génétiques utilisés dans les autres méthodes de classification des êtres vivants, elle permet de les confirmer ou, le plus souvent de les compléter lorsque ces critères ne sont pas suffisants.

Intérêts des macroalgues pour divers secteurs industriels

L'utilisation des macroalgues est réalisée depuis l'antiquité, notamment par leur exploitation dans l'alimentation humaine et animale. Cette pratique remonte au quatrième siècle au Japon et au sixième siècle en Chine (McHugh 2003). De nos jours, ces deux pays ainsi que la république de Corée représentent les plus importants consommateurs d'algues pour l'alimentation humaine.

Comme le montre la Figure 2, la production mondiale de macroalgues a augmenté depuis ces 10 dernières années passant de 9 millions de tonnes en 1998 à près de 16 millions de tonnes d'algues fraîches en 2007. Cette augmentation est essentiellement due à l'essor de l'algoculture (la culture d'algues), puisque cette dernière qui produisait 8 millions de tonnes d'algues fraîches en 1998, a produit en 2007 près de 15 millions de tonnes. Néanmoins, la production d'algues via la récolte de thalles sauvages est restée stable depuis ces 10 dernières années [2].

La Chine est le plus grand producteur mondial d'algues comestibles avec environ 10 millions de tonnes d'algues fraîches. La majeure partie de cette production est représentée par l'algue brune *Laminaria japonica* J.E. Areschoug utilisée pour la fabrication du kombu.

La république de Corée produit chaque année environ 800 000 tonnes d'algues fraîches. Parmi ce tonnage, environ 50%, représentés par la culture de l'algue brune *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar, sont utilisés pour la fabrication du wakamé.

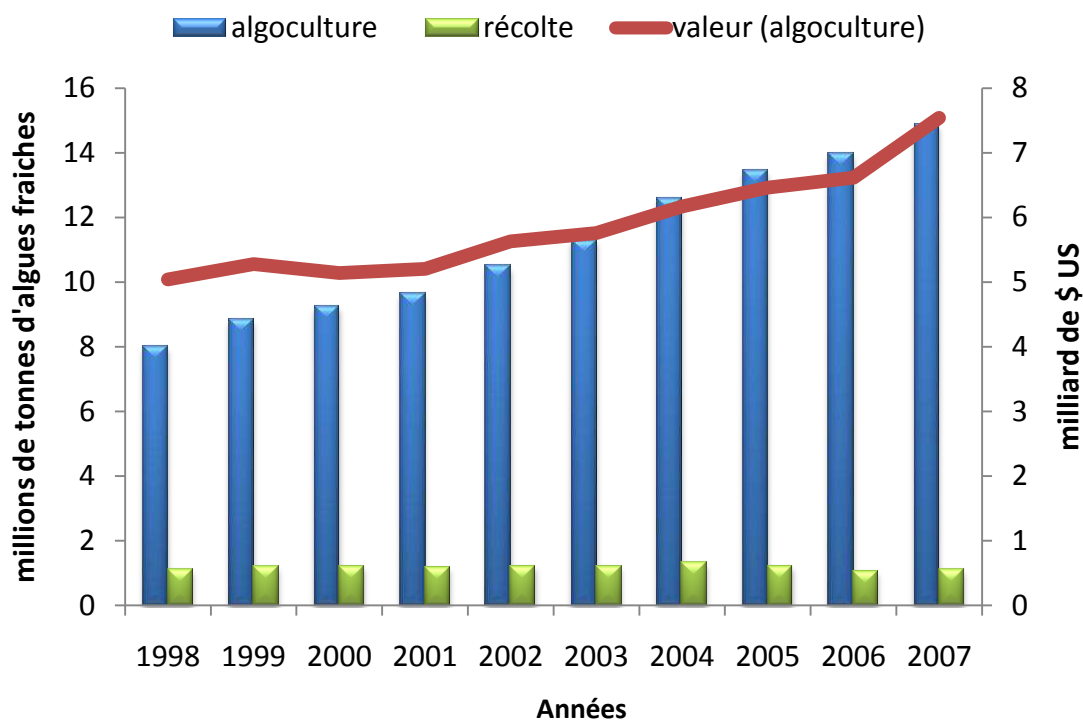


Figure 2 : Production mondiale d'algues (en tonnes de matière fraîche) et valeur de l'algoculture (en milliard de dollars US (US \$)) entre 1998 et 2007, d'après la FAO, données de 2009 [2].

La production japonaise est quant à elle évaluée à 600 000 tonnes d'algues fraîches dont 75% servent à la préparation du nori (entrant dans l'élaboration des sushis) à partir de l'algue rouge *Porphyra C. Agardh*. Le nori est un produit de valeur importante (environ 16 000 US\$/tonne de poids sec), comparé au kombu (2 800 US\$ /tonne de matière sèche) et au wakamé (6 900 US\$ /tonne de matière sèche) (McHugh 2003). Les algues rouges sont également utilisées pour la production de deux types d'hydrocolloïdes : l'agar et les carraghénanes. Les algues brunes sont quant à elles utilisées pour la production d'autres hydrocolloïdes, les alginates. Ces trois types de carbohydrates, solubles dans l'eau, sont utilisés pour augmenter la viscosité des solutions aqueuses, formant ainsi des gels ou des films hydrosolubles, et servant d'agents texturants dans divers produits tels que les crèmes glacées, les flans ou les dentifrices par exemple.

L'utilisation des algues comme source d'hydrocolloïdes remonte à 1658 au Japon quand furent découvertes les propriétés gélifiantes de l'agar extrait à l'eau chaude à partir d'une algue rouge. Au 18^{ème} siècle, des extraits de l'algue rouge *Chondrus crispus* Stackhouse, contenant des carraghénanes, furent utilisés comme un populaire agent épaississant. Enfin, il faut attendre les années 1930 pour que des extraits d'algues brunes, contenant des alginates, soient produits et commercialisés comme agent gélifiant et épaississant. L'exploitation industrielle d'extraits d'algues s'est ensuite intensifiée après la seconde guerre mondiale, limitée toutefois par la disponibilité en matière première. Pour faire face à cette demande, la

culture des algues s'est développée et fournit de nos jours une grande proportion des algues utilisées dans la production d'hydrocolloïdes. Ainsi, environ 1 million de tonnes d'algues fraîches sont récoltées et extraites chaque année pour cette industrie. La production totale annuelle d'hydrocolloïdes s'élève à environ 55 000 tonnes, représentant une valeur de l'ordre de 585 millions US\$ (McHugh 2003).

En Bretagne, la production d'alginate (213 millions US\$/an) est réalisée à partir d'algues brunes sauvages telles *Laminaria digitata* (Hudson) J.V. Lamouroux, la culture de celles-ci s'avérant trop coûteuse pour servir comme source de matière première pour l'industrie.

Les algues brunes sont également utilisées comme complément alimentaire pour le bétail. La Norvège est le pays pionnier de cette industrie qui s'y est développée dans les années 1960. Approximativement 50 000 tonnes d'algues fraîches sont ainsi récoltées chaque année aboutissant à la production de 10 000 tonnes de complément alimentaire, représentant une valeur marchande d'environ 5 millions \$US (McHugh 2003).

L'utilisation des grandes algues brunes comme fertilisant remonte au moins au 19^{ième} siècle. Le contenu important en fibres des algues conditionne le sol et permet de retenir l'humidité, tandis que les minéraux et en particulier les sels de sodium et de potassium qu'elles contiennent, agissent comme fertilisant et source d'éléments traces. La plus forte croissance dans ce domaine est actuellement enregistrée pour les extraits liquides d'algues. Ceux-ci sont produits sous forme concentrée que l'utilisateur dilue ensuite avant emploi. En 1991, on estimait à environ 10 000 tonnes d'algues fraîches utilisées pour obtenir 1 000 tonnes d'extraits pour une valeur marchande avoisinant les 5 millions \$US. Néanmoins, le marché a probablement doublé lors de la dernière décennie du fait d'une demande de plus en plus forte en agriculture biologique où ces extraits s'avèrent particulièrement efficaces, notamment en ce qui concerne la croissance des fruits et légumes.

L'industrie cosmétique est également intéressée par les algues marines. Les produits cosmétiques tels que les crèmes et lotions, utilisent parfois les appellations «extrait marin», «extrait d'algue» ou similaires. Dans la plupart des cas cela signifie qu'un hydrocolloïde d'origine algale a été ajouté à la préparation. Ainsi, les alginates et carraghénanes peuvent améliorer les propriétés hydratantes du produit en augmentant la capacité de la peau à retenir l'eau.

Les algues sont aussi utilisées dans le traitement des eaux usées. Ainsi, certaines algues sont capables d'absorber les métaux lourds présents dans les eaux polluées. L'aquaculture intégrée illustre bien cette propriété qu'ont les algues à utiliser les déchets de l'aquaculture comme source de nutriments. Les eaux provenant des exploitations piscicoles contiennent des taux de déchets élevés pouvant poser des problèmes à

la vie aquatique adjacente. Pour éviter cette pollution, des essais ont été menés visant à établir des cultures d'algues adjacentes aux exploitations piscicoles pour épurer les élevages.

Enfin, les macroalgues représentent un potentiel grandissant de valorisation en médecine et pharmacie. En effet, au cours des 40 dernières années, 3 554 articles décrivant l'isolement de nouvelles molécules actives d'origine algale et/ou les activités biologiques d'extraits ou de métabolites algaux ont été publiés. Parmi ces articles, plus de 3 280 concernaient la publication de structures chimiques de nouveaux composés isolés de macroalgues marines. Cela équivaut à environ 30% des substances naturelles isolées de macroalgues marines. Comme le montre la Figure 3, la recherche et l'isolement de composés bioactifs chez les macroalgues a considérablement augmenté depuis les années 1960. En effet, le nombre d'articles scientifiques publiés concernant les substances naturelles issues des macroalgues sont passées de quelques centaines dans les années 1960, à près de 1200 dans les années 2000. Ce graphique nous montre également que le nombre d'articles publiés, tout comme le nombre de composés identifiés chez les macroalgues, a diminué dans les années 2000 par rapport aux années 1990 (Ioannou et Roussis 2009) (Figure 3).

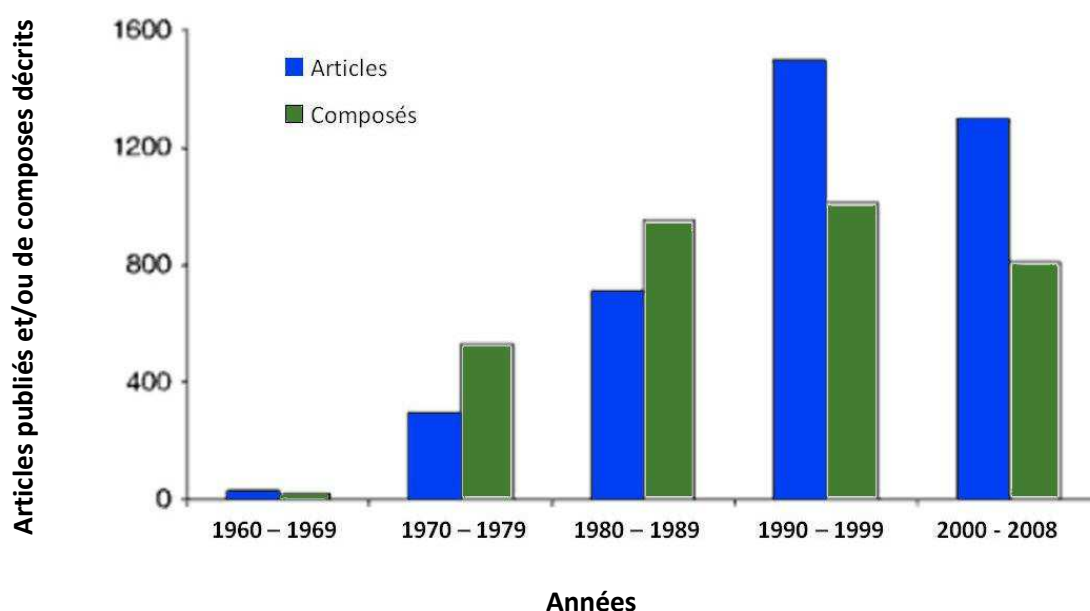


Figure 3 : Nombres d'articles concernant la recherche et les composés issus des macroalgues marines (modifié d'après Ioannou et Roussis 2009).

Concernant le nombre de métabolites identifiés chez les algues rouges (Figure 4), après une très forte augmentation au cours des années 1960, il est à peu près constant depuis les années 1970 : un peu moins de 40 nouveaux composés sont identifiés chaque année. L'identification des métabolites des algues vertes et brunes a été croissante jusqu'à la fin des années 1990 pour connaître une baisse au cours de la dernière décennie.

Durant les années 1980 et 1990, plus de 1 000 composés ont été identifiés chez les algues brunes alors que ce chiffre est plus faible quand on s'intéresse aux algues rouges et vertes : moins de 800 chez les algues rouges et moins de 300 chez les algues vertes (Figure 4).

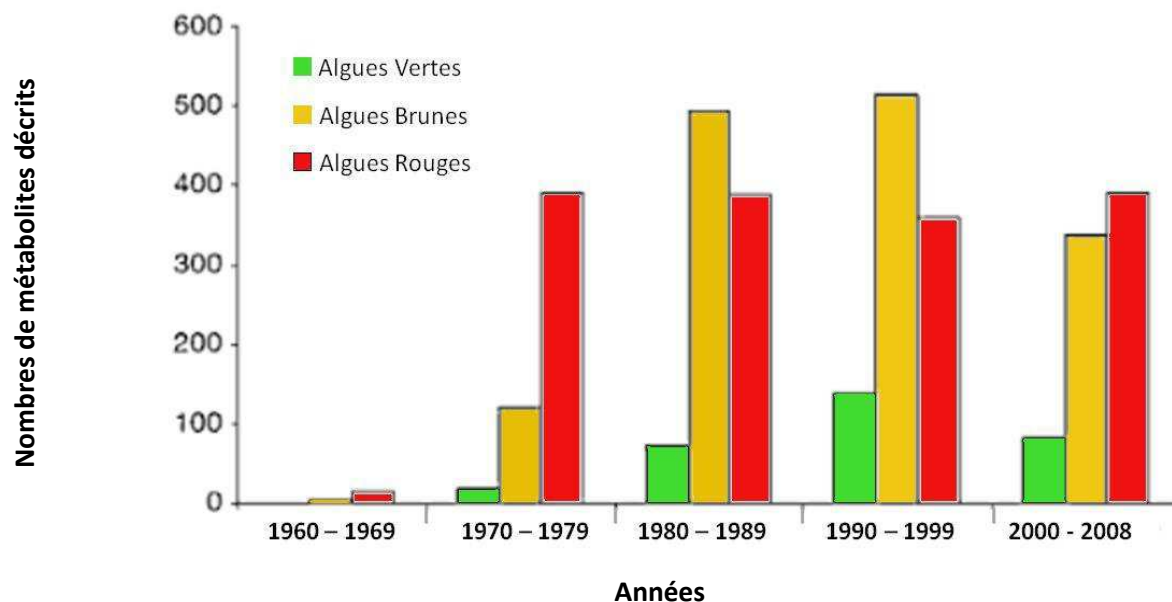


Figure 4 : Nombres de métabolites identifiés chez les algues vertes, brunes et rouges entre 1960 et 2008 (modifié d'après Ioannou et Roussis 2009).

La richesse en métabolites des algues rouges et brunes s'expliquent par la présence chez ces organismes de substances halogénées qui intéressent les scientifiques (Ioannou et Roussis 2009).

La majorité des substances actives découvertes par les laboratoires n'intéresse pas les groupes pharmaceutiques pour une utilisation dans l'élaboration de nouveaux médicaments. En effet, seuls quelques composés rentrent dans la composition de certains médicaments ou produits industriels. A titre d'exemple, les polysaccharides sulfatés sont utilisés pour leur action antivirale, les furanones halogénées isolées de l'algue rouge *Delisea pulchra* sont utilisées dans la défense antifouling, le kahalalide F provenant d'une espèce de *Bryopsis* a un avenir prometteur dans le traitement des cancers de la langue, de certaines tumeurs et du virus VIH. D'autres substances telles que les lectines, les fucoïdanes et les kainoides sont couramment utilisées en recherche biomédicale et un grand nombre d'autres composés possèdent des activités biologiques (McHugh 2003). Parmi les activités biologiques les plus recherchées par les scientifiques, les composés cytotoxiques arrivent en tête, suivis des composés antibiotiques et antifongiques, puis des composés anti-inflammatoires et antifouling et enfin des composés anti-VIH et antioxydants (Ioannou et Roussis 2009) (Figure 5).

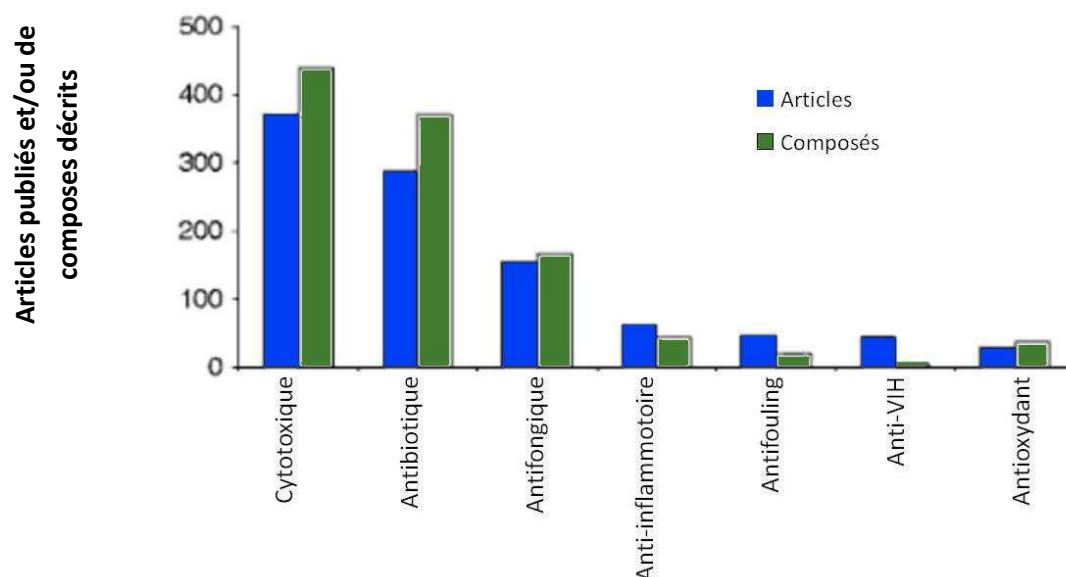


Figure 5 : Distribution de l'activité des métabolites identifiés chez les macroalgues marines (modifié d'après Ioannou et Roussis 2009).

Contexte, objectifs de cette étude et plan du manuscrit

Cette thèse s'inscrit dans le cadre d'une **recherche de molécules d'intérêts au sein d'espèces de la famille des Sargassaceae**. Etant donné le caractère cosmopolite de cette famille d'algues brunes, il était intéressant d'étudier les représentants de cette famille dans les deux milieux colonisés : en milieu tropical et en milieu tempéré. Ainsi, une partie de la thèse s'inscrit dans le cadre de deux projets de recherche avec un objectif ultime de comprendre **comment les Sargassaceae se défendent face à leur environnement** et de **trouver des voies d'applications possibles de certains représentants de cette famille**. En milieu tropical, les projets de recherche intitulés « Connaissance des écosystèmes : amélioration des inventaires, prospection et taxonomie » et « Valorisation : substances marines (recherche de molécules présentant un intérêt potentiel dans différents domaines de la santé) » ont été déposés au CRISP : « Coral Reef Initiative for South Pacific » (Initiative pour la protection et la gestion durable des récifs coralliens dans le Pacifique Sud) et financés par l'Agence Française de Développement (AFD). Le CRISP a eu pour but de développer une vision pour l'avenir des écosystèmes uniques du Pacifique Sud et des communautés qui dépendent d'eux, ainsi que de présenter des stratégies et des projets de conservation de la biodiversité, en développant des services économiques et environnementaux au niveau local comme à l'échelle mondiale. Les objectifs spécifiques de cette initiative sont :

- une meilleure connaissance de la biodiversité, de l'état et du fonctionnement des écosystèmes coralliens,
- la réalisation d'opérations de protection et de gestion des écosystèmes coralliens à une échelle significative,
- la valorisation du potentiel économique reposant sur les valeurs d'usage et la biodiversité des écosystèmes coralliens
- et enfin la diffusion de l'information et des savoirs , renforcement des capacités et animation des réseaux locaux, nationaux et internationaux.

Parmi les composantes du projet de recherche du CRISP, la composante 2C intitulée « Valorisation des substances actives marines » a pour objet de contribuer à une meilleure connaissance et valorisation d'organismes benthiques des écosystèmes récifo-coralliens pouvant contenir des substances marines à activité pharmacologique. C'est dans le cadre de cette composante que s'inscrit une partie de cette thèse, par (i) l'étude de la chimiotaxonomie du genre *Turbinaria* (composante 2C-2) et (ii) l'étude des Sargassaceae, comme source potentielle de composé(s) à activité(s) biologique(s), étant donnée leur forte abondance en milieu tropical (composante 2C-3).

Les Sargassaceae sont également abondantes en milieu tempéré. A titre d'exemple, sur les côtes bretonnes, *Sargassum muticum* est une espèce, introduite, qui devient très abondante durant la période estivale (Plouguerné *et al.* 2006). En Bretagne, l'importante biomasse des algues brunes intéresse les industriels. Nous avons ainsi choisi de suivre localement des espèces de Sargassaceae tempérées afin de pouvoir comparer les modèles d'étude en milieux tropical et tempéré.

Néanmoins, la valorisation des organismes benthiques n'a de sens que si la ressource, ici les Sargassaceae, est parfaitement maîtrisable. C'est pourquoi, en plus de rechercher des substances potentiellement bioactives, nous avons tenté, d'une part de mieux comprendre la biologie des populations de Sargassaceae via un suivi écologique et une étude de leurs composés de défense, et d'autre part, de rechercher des chimiomarqueurs spécifiques à certaines espèces afin de faciliter leur identification future en cas de valorisation de leur biomasse.

Ainsi pour répondre à ces trois objectifs, une **étude pluridisciplinaire**, liant des études écologiques et chimiques, a été menée.

Dans **un premier Chapitre**, les deux milieux colonisés par ces Sargassaceae et étudiés dans ce travail de thèse sont exposés ainsi que les sites d'étude sélectionnés. Ensuite, la famille des Sargassaceae et

les espèces étudiées sont présentées en s'appuyant sur leur taxonomie, leur mode de reproduction et leur écologie. Ainsi, trois espèces ont été étudiées en milieu tempéré : *Sargassum muticum*, *Bifurcaria bifurcata* et *Cystoseira baccata* et les deux genres *Sargassum* (3 espèces) et *Turbinaria* (3 espèces) ont été suivis en milieu tropical.

Le **Chapitre II** traite ensuite de **l'écologie chimique des Sargassaceae**. En milieu tempéré, cette thématique a été étudiée via un suivi écologique des populations associé à l'étude des variations spatio-temporelles de certains composés de défense, étudiées sur 2 sites du littoral breton. Parallèlement, **en milieu tropical**, ces mêmes composés de défense ont été suivis sur différents sites, au sein de différents archipels, afin de caractériser l'écologie chimique des Sargassaceae du Pacifique Sud.

Parallèlement à ce travail de terrain, **une étude de chimiotaxonomie** a été menée sur deux taxons modèles et à différents niveaux : au point de vue interspécifique, en s'intéressant au genre *Turbinaria*, et au point de vue intraspécifique par l'étude des variétés chimiques de *Bifurcaria bifurcata*. Ces deux études sont présentées dans le **Chapitre III** de ce manuscrit.

Dans le but de trouver des voies de valorisation possibles des Sargassaceae de milieux tempérées et tropicales (et ainsi répondre à l'un des objectifs du CRISP en milieu corallien), le **Chapitre IV** aborde la **recherche de composés bioactifs** au sein des espèces tropicales et tempérées. Parmi les activités biologiques recherchées, quatre activités biologiques ont retenu notre attention : la cytotoxicité, l'activité anti-inflammatoire, la neurotoxicité et l'activité antioxydante.

Enfin, ce manuscrit se clôt par une **synthèse des résultats et les perspectives** qu'offre ce travail de thèse.

La majorité des résultats obtenus au cours de ce travail de thèse sont présentés sous la forme de manuscrits soumis à publication ou d'articles déjà parus. Chaque manuscrit est devancé par un résumé en français des principaux résultats obtenus.

CHAPITRE I : CONTEXTE GENERAL DE L'ETUDE : SITES D'ECHANTILLONNAGE ET MODELES BIOLOGIQUES

1. Présentation des sites d'échantillonnage

1.1. Généralités sur la colonne d'eau

Au sein des océans du globe, deux environnements différents sont observés : l'environnement pélagique, lié aux masses d'eau et l'environnement benthique, lié aux fonds des océans. Les macroalgues étudiées dans ce travail de thèse sont des espèces benthiques. De ce fait, seul cet environnement est décrit.

L'environnement benthique est constitué de diverses parties comme les présente la Figure 6.

La **zone littorale** est divisée en trois étages. Un étage est défini comme un espace vertical du domaine benthique au sein duquel règnent des conditions physico-chimiques relativement homogènes. Le premier est **l'étage supralittoral**. C'est la zone des embruns où vivent les lichens et les végétaux halophiles terrestres. Puis, apparaît **l'étage médiolittoral**. Cet étage correspond à la zone de balancement des marées, située entre le niveau moyen des hautes mers de vives eaux et celui des basses mers de vives eaux. L'étage médiolittoral est aussi appelé **estran** ou **zone intertidale**. Enfin, **l'étage infralittoral** correspond à une zone immergée en permanence située entre le niveau moyen des basses mers de vives eaux et la limite des peuplements à macroalgues photophiles.

La **zone profonde** est constituée de quatre étages dont le premier est **l'étage circalittoral** situé du bas des peuplements à macroalgues photophiles jusqu'à la limite du plateau continental. Cet étage circalittoral, présentant des variations environnementales faibles, comporte deux zones distinctes : le circalittoral côtier au sein duquel poussent des macroalgues sciaphiles et le circalittoral du large au sein duquel aucune macroalgue à thalle dressé ne vit. Ensuite, se succèdent **l'étage bathyal**, correspondant à la pente continentale, entre 200 et 4000 m de profondeur en moyenne et **l'étage abyssal** situé au-delà de 4000 m de profondeur. L'étage abyssal constitue 80% du domaine benthique. Les fosses océaniques, dont les profondeurs dépassent les 6 000 m, forment le dernier étage de la zone profonde : **l'étage hadal**.

Dans l'environnement marin, les macroalgues ne sont retrouvées qu'au niveau des étages médio-, infra- et circalittoral (Figure 6). En effet, leur répartition bathymétrique est limitée, notamment par leur capacité photosynthétique mais aussi par la turbidité de l'eau qui va influencer la pénétration des radiations lumineuses. Néanmoins, que ce soit en milieu tropical comme en milieu tempéré, les macroalgues montrent une diversité et une abondance maximales dans les 30 premiers mètres.

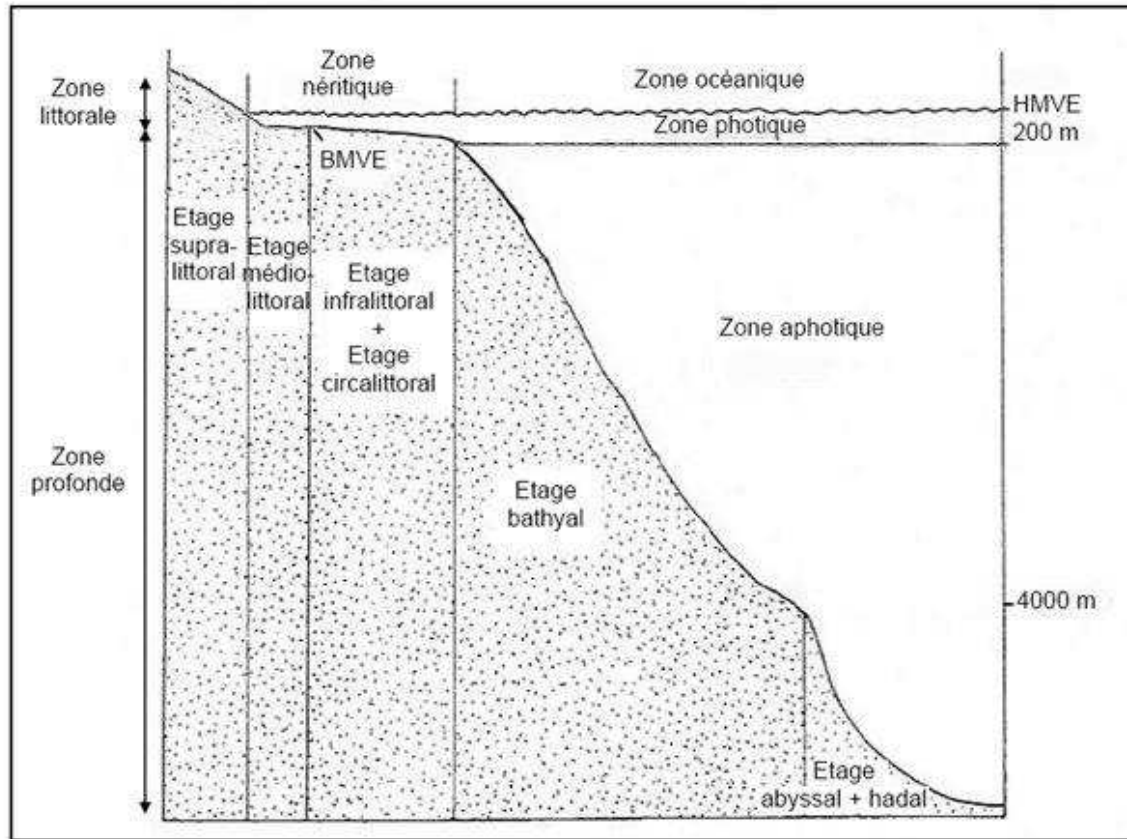


Figure 6 : Divisions de l'environnement marin (d'après Lee 1999). HMVE : niveau moyen des hautes mers de vives eaux , BMVE : niveau moyen des basses mers de vives eaux.

Au niveau de la zone intertidale, le phénomène des marées engendre des cycles d'émersion et d'immersion qui entraînent des fluctuations importantes des paramètres physico-chimiques comme la température ou la salinité. Ces variations vont conditionner l'étagement des êtres vivants, et notamment des populations de macroalgues brunes. Cet étagement est d'autant plus marqué que les amplitudes de marée, et donc le marnage, sont importants.

1.2.Zones géographiques étudiées

Au cours de ce travail, deux zones géographiques ont été étudiées (Figure 7).

La pointe Bretagne a été choisie, d'une part pour sa richesse spécifique en algues marines et son accessibilité par rapport à la situation géographique du laboratoire et d'autre part, pour la présence d'espèces de Sargassaceae, abondantes et facilement accessibles à marée basse. Si une des espèces de Sargassaceae, présente en Bretagne, a été fortement étudiée de part son caractère potentiellement invasif, les espèces

natives sont, quant à elles, peu étudiées. Cet état des connaissances des Sargassaceae bretonnes a joué une part importante dans le choix de la zone d'étude. La Bretagne, située à l'Ouest de l'Europe, sur la côte atlantique, bénéficie d'un climat tempéré océanique.

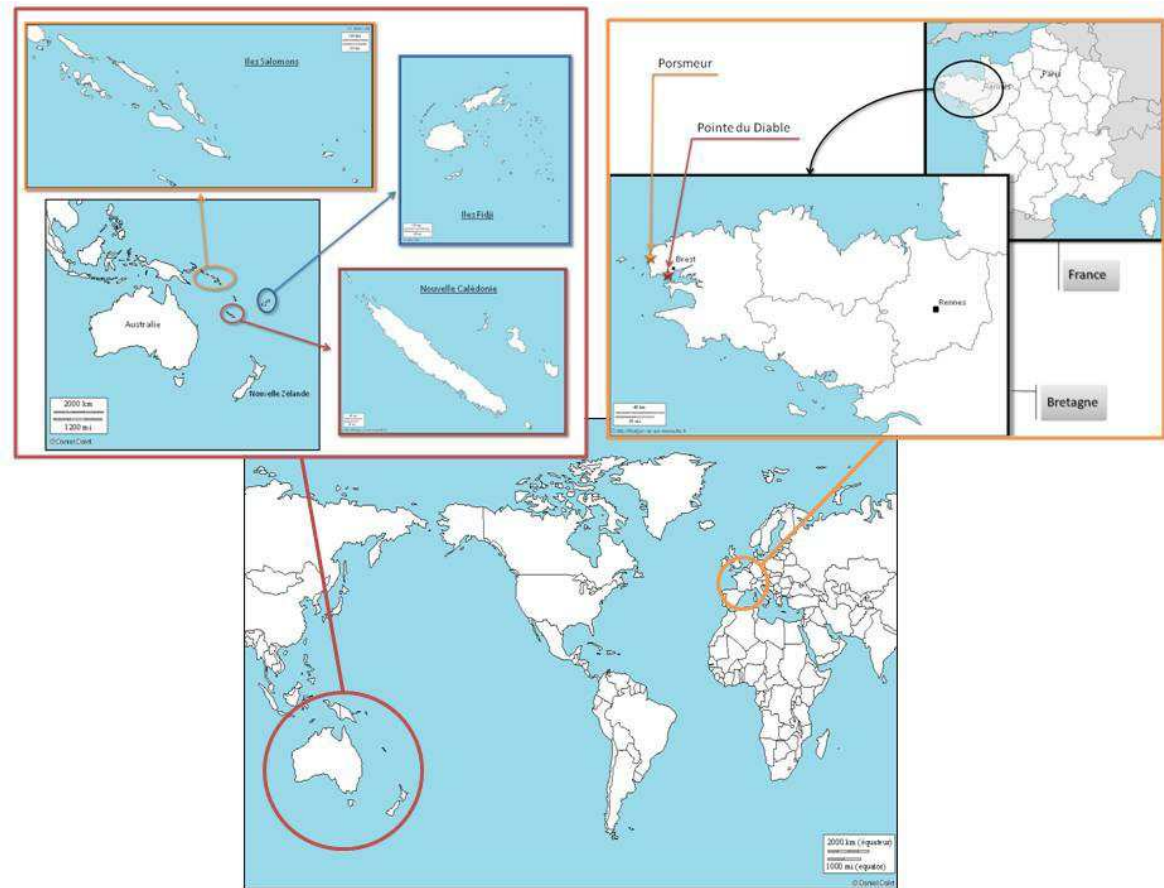


Figure 7 : Vue d'ensemble des zones géographiques étudiées.

Le Pacifique Sud a été choisi, d'une part par la rareté des études menées dans cette partie du globe et d'autre part par l'opportunité d'une campagne de récolte organisée dans le cadre du projet d'étude des écosystèmes coralliens du Pacifique Sud (CRISP/AFD, cf. introduction générale). Le Pacifique Sud, situé au Nord-Est de l'Australie et au Sud-Est des archipels d'Indonésie et de Malaisie, bénéficie d'un climat tropical humide.

1.2.1. La Bretagne et son littoral

Bordée par la mer sur les quatre cinquième de son pourtour (Manche au Nord, golfe de Gascogne au Sud et mer d'Iroise à l'Ouest), la Bretagne est située à l'extrémité Nord-Ouest de la France et compte

2 730 km de côtes, ce qui en fait la région bénéficiant de la plus grande longueur de côte en France métropolitaine (40% du linéaire côtier de la Métropole). L'estran breton, c'est-à-dire la zone de balancement des marées, a une superficie de 27 209 km². La Bretagne présente un littoral majoritairement rocheux, ce qui le différencie des littoraux de Normandie (hormis le Cotentin) et de Vendée, essentiellement sableux. La myriade d'îles et d'îlots qui parsème le littoral n'est que l'échine d'un énorme platier rocheux de 3 407 km² qui correspond au prolongement, sous la mer, du massif armoricain. Les fonds marins bretons forment une mosaïque exceptionnelle d'habitats en Europe : roches, cailloutis, graviers, sables et vases se côtoient sur de petites surfaces et favorisent une grande biodiversité.

Autour de la Bretagne, deux masses d'eau sont identifiées. Au Sud, l'Océan Atlantique présente des eaux stratifiées en été par une thermocline entre les eaux chaudes de surface et les eaux froides de fond alors qu'au Nord et autours des archipels d'Ouessant, de Molène et de Sein, la Manche et la Mer d'Iroise ont des eaux homogènes car brassées en toutes saisons par la houle et les courants (Figure 8).

Deux fronts sont présents entre ces masses d'eau : le front d'Ouessant à l'Est des archipels d'Ouessant et de Molène et le front interne de l'Iroise à la sortie de la Rade de Brest et de la Baie de Douarnenez. De part l'existence de ce front interne de la mer d'Iroise, la Rade de Brest et la Baie de Douarnenez présentent des eaux stratifiées en été (Figure 8). De plus, il existe en Manche, un gradient thermique croissant d'Est en Ouest (Le Corre et Birrien 1985, Morin *et al.* 1994).

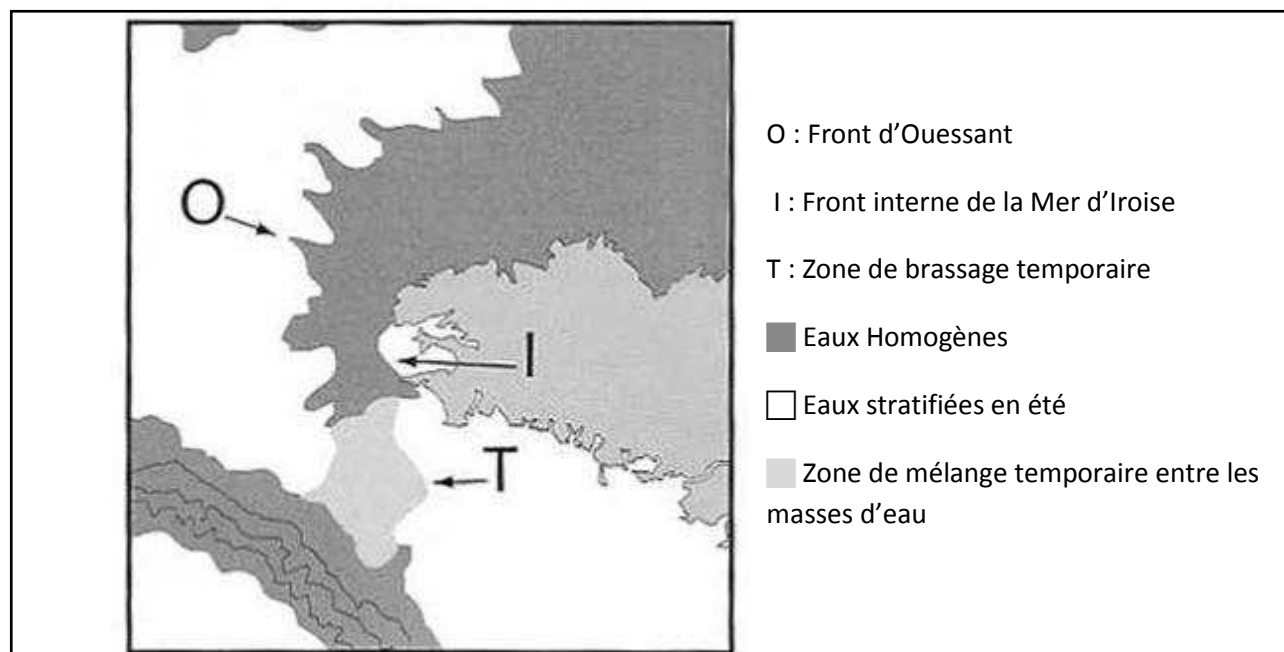


Figure 8 : Les différentes masses d'eau bordant le littoral breton (Castric-Faey *et al.* 2001).

Les eaux du large sont salées (35‰) et claires. Cette clarté des eaux océaniques, notamment autour des îles, permet le développement de peuplements considérables de végétaux marins dont les phanérogames telles *Zostera marina* (Hily *et al.* 1999) ou les macroalgues (Floc'h 1967). Les eaux côtières sont souvent légèrement dessalées et turbides à cause des panaches fluviaux notamment de la Loire et de la Vilaine dans la partie Sud de la Bretagne (Le Corre et Birrien 1985) mais aussi à cause d'un réseau hydrographique dense (1 km/km^2). Celui-ci s'étend sur 30 000 km de cours d'eau et se découpe en plus de 560 bassins versants débouchant à la mer [4].

Sur le littoral breton, le marnage est important. En période de marée de vives eaux, son maximum est de 14 m dans la baie du Mont-Saint-Michel, puis il diminue en allant vers l'Ouest (Figure 9). Il est de l'ordre de 8 m à Roscoff, de 6 m à Brest et il se réduit encore en redescendant vers le Sud de la Bretagne. Il se stabilise à une valeur proche de 5 m sur la côte Atlantique, de la Pointe du Raz à Saint Nazaire.

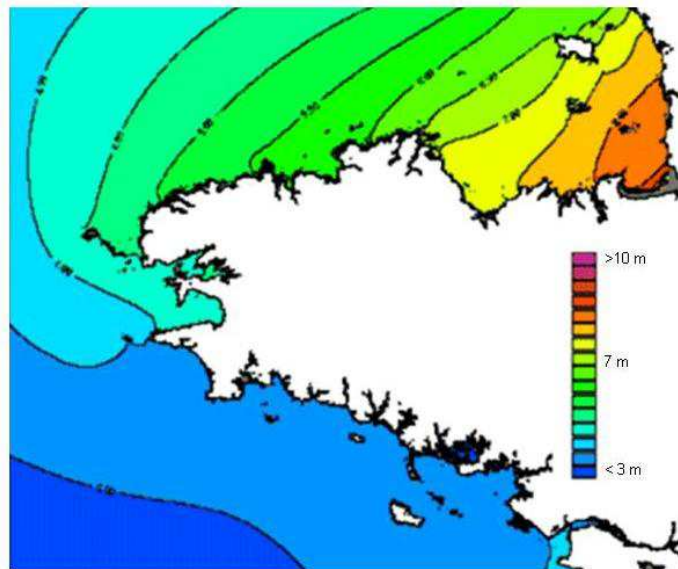


Figure 9 : Marnage moyen (m) sur les côtes bretonnes (d'après [3] in Connan 2004).

La marée, en créant le déplacement de masses d'eau importantes sur un laps de temps court, provoque la formation de courants importants près des côtes. Leur vitesse dépend de la forme du littoral, de la profondeur et des caractéristiques de la marée (cycle de marée de vives eaux/mortes eaux). Ces courants sont souvent forts dans les zones de rétrécissements (raz de Sein, goulet de Brest, etc.) et au contraire, plus faibles dans les baies (baie de Saint-Brieuc, baie du Mont-Saint-Michel, baie de Douarnenez, à titre d'exemples) ce qui permet aux sédiments fins de s'y déposer. Sur la côte Nord, les courants de marée atteignent souvent des vitesses de l'ordre de 3 nœuds (soit $1,5 \text{ m/s}$) et jusqu'à 9 nœuds au passage du Fromveur entre les archipels de Molène et Ouessant. Sur la côte Sud, ces courants sont rotatifs et ne font, généralement, pas plus de 0,5 à 1 nœud.

La Bretagne est exposée directement à la houle de l'Atlantique qui est prépondérante dans la zone de balancement des marées et du trait de côte. Son impact dépend de son origine (direction, période) ainsi que de la morphologie du littoral. Les fortes houles dominantes, orientées Ouest/Sud-Ouest battent la pointe de la Bretagne et produisent, à Ouessant, des vagues pouvant atteindre 16 m. D'une manière générale, le choc de la houle est amorti par les îlots et les récifs côtiers qui agissent comme des barrières naturelles. Ses effets changent également en fonction de l'orientation du trait de côte (Bellessort et Migniot 1987).

Le climat océanique doux (étés frais et hivers doux, entre 7 et 17°C en moyenne) et humide de la Bretagne trouve son origine d'une part dans la dérive Nord-Atlantique qui crée un mouvement d'eaux océaniques prolongeant le *Gulf Stream* et d'autre part dans un système atmosphérique dominé par la présence de l'anticyclone des Açores et de la zone dépressionnaire d'Islande. Toutes ces caractéristiques : importance des côtes rocheuses, fort marnage, confluence de deux masses d'eau, se traduisent par une grande richesse spécifique en macroalgues. En effet, près de 700 espèces de macroalgues ont été recensées sur le littoral breton, dont 580 genres différents (Dizerbo et Herpe 2007). De plus, la Bretagne est un carrefour biogéographique particulier comme ceci est présenté dans l'encadré I-1.

Les macroalgues brunes, de l'ordre des Fucales, forment, seules ou en association, des peuplements sous forme de ceintures caractéristiques d'un niveau de marée et d'un mode donné au sein de l'étage médiolittoral (Floc'h 1967). Ces ceintures de Phaeophyceae de grande taille assurent à d'autres espèces végétales de taille plus réduite et à des animaux, une protection contre la dessiccation, les variations brutales de température et l'exposition directe aux rayons solaires lors de l'émersion, tout en permettant un éclaircissement suffisant en phase d'immersion.

Cette zonation verticale des macroalgues brunes sur l'estran, due aux cycles d'immersion et d'émersion de la marée, subit de larges variations géographiques du fait de plusieurs facteurs tels que (1) l'hydrodynamisme et (2) la nature du substrat.

(1) L'hydrodynamisme a une influence directe sur la zonation, via une action mécanique, en éliminant les organismes qui ne sont pas adaptés à sa force, et une influence indirecte en modifiant les relations biotiques comme la compétition ou la pression du broutage (Floc'h 1964, Little et Kitching 1996). Des modifications dans l'étagement de l'ensemble des espèces végétales et animales sont alors visibles (Figure 10). Selon l'exposition à la houle et aux vagues, on distingue 3 modes d'hydrodynamisme différents : le mode abrité (ou calme), le mode battu (ou exposé), et un mode intermédiaire semi-battu (ou semi-abrité). Le mode abrité correspond généralement à un site côtier, en fond de baie ou protégé par une barrière

rocheuse, par opposition au mode battu rencontré autour des récifs du large, des pointes rocheuses ou sur les côtes ouvertes face aux vents dominants de secteur Ouest.

(2) La texture et le type de substrat affectent les microhabitats dans lesquels les propagules ou les spores de macroalgues peuvent se fixer. Ainsi sur un estran battu, les fissures permettent la fixation de nombreuses macroalgues leur assurant une protection face aux houles et une humidité relativement importante lors des basses mers (Little et Kitching 1996). D'une manière générale, le substrat peut être, soit rocheux (roche, blocs rocheux plus ou moins grands...), soit meuble (sables, graviers, débris de coquillages, vases).

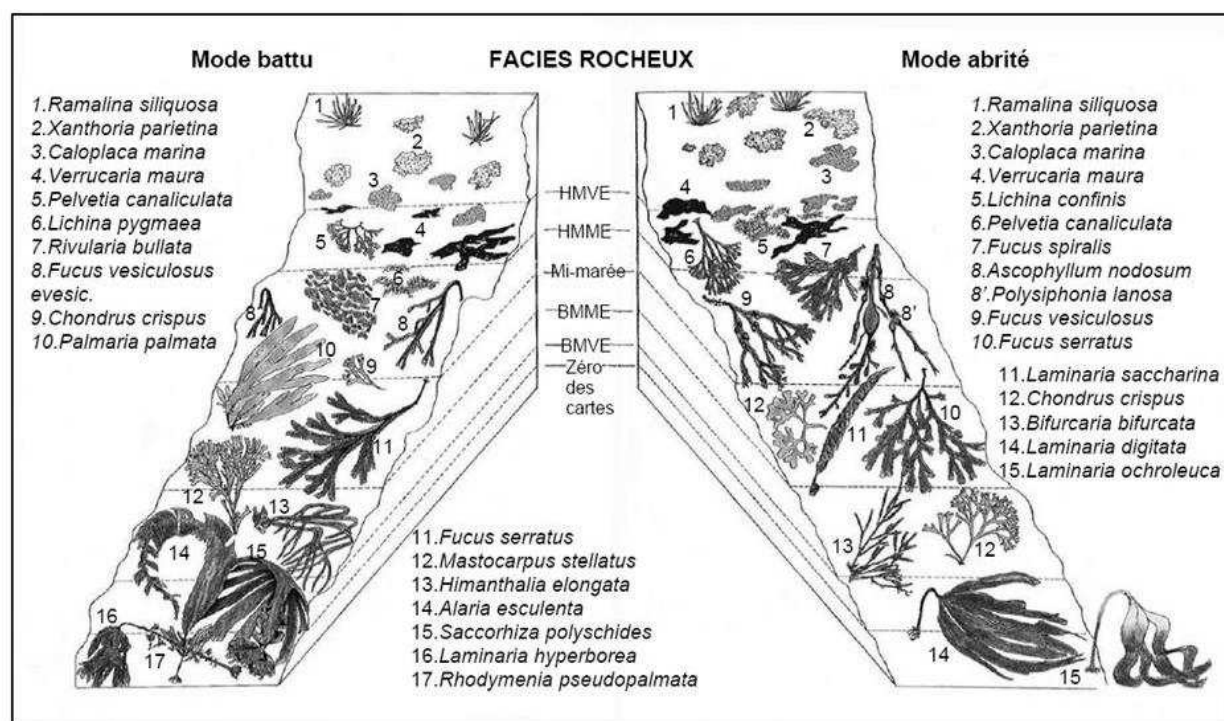


Figure 10 : Diagramme de l'étagement vertical de la végétation marine en zone tempérée du Nord-Est Atlantique. HMVE : niveau moyen des hautes mers de vives eaux , HMME : niveau moyen des hautes mers de mortes eaux , BMME : niveau moyen des basses mers de mortes eaux, BMVE : niveau moyen des basses mers de vives eaux , Zéro des cartes : niveau des plus basses mers (Floc'h 1964, modifié d'après Cabioc'h *et al.*, 2006).

Encadré I-1 : Situation biogéographique de la Bretagne

La Bretagne fait partie d'une zone de transition ou carrefour biogéographique entre la région atlantique tempérée froide du Nord de l'Europe et la région atlantique tempérée chaude du Sud de l'Europe (Figure 11). En effet, sur les côtes atlantiques européennes, deux régions biogéographiques se succèdent du Nord (notée A) au Sud (notée B). Le domaine côtier qui s'étend de l'Islande à la mer Baltique en passant par l'Ouest de l'Irlande forme la région boréo-atlantique de climat tempéré froid (A). Une région méditerranéo-atlantique, de climat tempéré chaude, lui fait suite, de l'Ouest de l'Irlande jusqu'à la Mauritanie (B). Au sein de cette vaste région, la province lusitanienne borde les côtes atlantiques européennes du Sud de l'Irlande au Nord du Maroc. La zone de transition entre ces deux régions s'étend de l'Irlande à la Bretagne.

C'est dans cette zone que se retrouvent les plus grandes richesses floristiques de l'Atlantique Nord-Est. En effet, la flore marine de l'atlantique Nord européen compte actuellement plus de 800 espèces de végétaux marins dont près de 700 espèces de macroalgues recensées sur le littoral breton. Cette forte biodiversité s'explique par la présence d'espèces Nordiques et méridionales (Cabioc'h *et al.* 2006, Dizerbo et Herpe 2007).

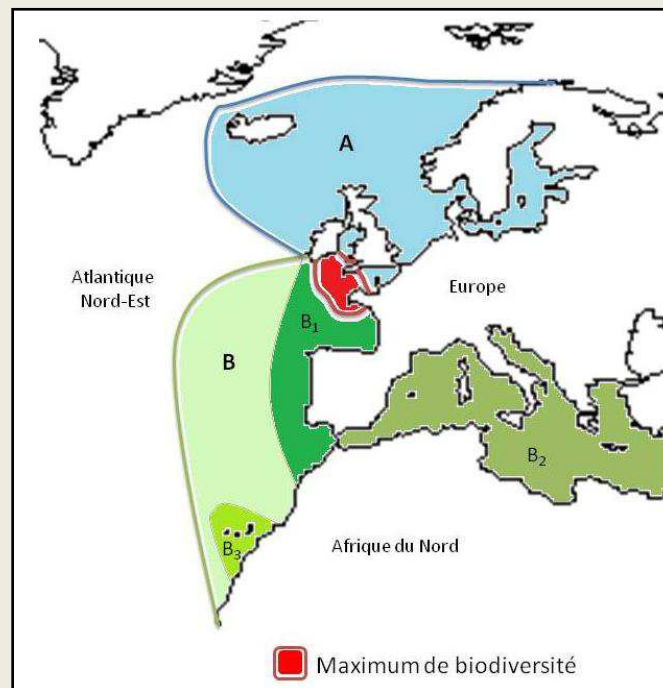


Figure 11 : Régions biogéographiques de l'Atlantique Nord-Est : A : Région atlantique tempérée froide, boréo-atlantique, B : Région méditerranéo-atlantique, tempérée chaude (B1 : province lusitanienne, B2 : province méditerranéenne, B3 : province canarienne). Le maximum de biodiversité est recensé dans la zone de transition entre les deux régions (en rouge).

Sur les estrans rocheux, les cuvettes ou mares de l'étage médio-littoral présentent une grande richesse spécifique en macroalgues, et ceci, même en milieu battu. En effet, ces cuvettes permettent non seulement une "remontée" des macroalgues de l'infra-littoral au médiolittoral car les algues y sont constamment immergées, mais aussi une certaine protection des espèces contre l'hydrodynamisme. Cependant, les conditions de vie sont différentes de celles de la zone infra-littorale. En effet, les paramètres physiques (température, pH, salinité, concentration en oxygène et dioxyde de carbone dissous et dérivés) évoluent de façon drastique dans ces cuvettes au cours d'une marée et ce, particulièrement en été. Les espèces retrouvées dans ces mares sont donc **euryèces**, c'est-à-dire qu'elles supportent de fortes variations des facteurs abiotiques, en particulier de fortes amplitudes de la température et de la salinité. Les mares des différents niveaux ne contiennent pas les mêmes espèces de macroalgues et il en résulte une zonation de la flore des cuvettes. A l'intérieur de celles-ci, les algues se disposent en couronne et il apparaît une microzonation des espèces. Sur la Figure 12 sont présentés trois exemples de mares suivant leur position sur l'estran avec leur peuplement de macroalgues.

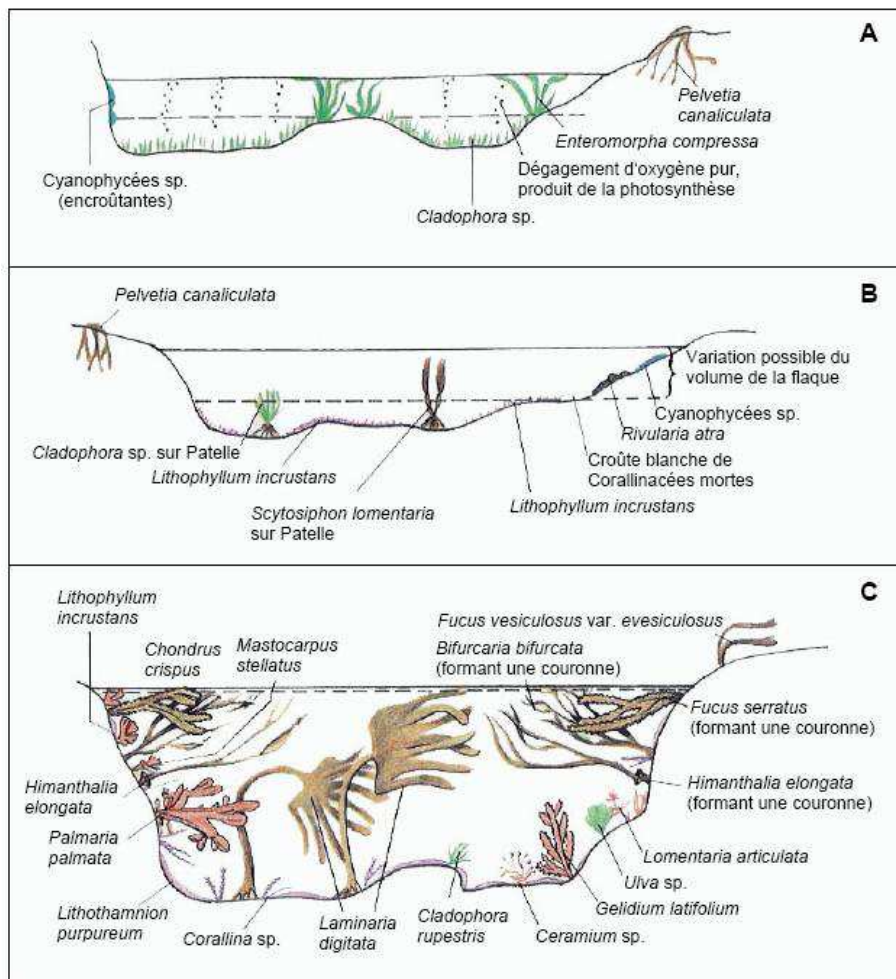


Figure 12 : Etagement vertical du peuplement des cuvettes en milieu rocheux. A et B : cuvettes des hauts niveaux de l'estran , C : mare de la mi-marée (Cabioc'h *et al.* 2006).

1.2.2. Le Pacifique Sud et les archipels étudiés

Le Pacifique Sud est constitué d'un ensemble d'îles et d'archipels appartenant à l'Océanie, qui va des îles Mariannes au Nord-Ouest à l'archipel de Pitcairn au Sud-Est, en passant par la Papouasie Nouvelle-Guinée, la Nouvelle-Calédonie et les îles Kiribati, soit une superficie d'environ 823 558 km² (Figure 13). Cette région présente un climat tropical avec deux saisons marquées : une saison chaude et pluvieuse de mi-novembre à mi-avril et une saison fraîche et sèche de mi-mai à mi-septembre. Les Alizés soufflant d'Est à Sud-Est sont largement dominants et très souvent forts (> 20 noeuds). Des vents d'Ouest sont également fréquents durant la saison fraîche et lors de dépressions ou de cyclones (saison chaude).

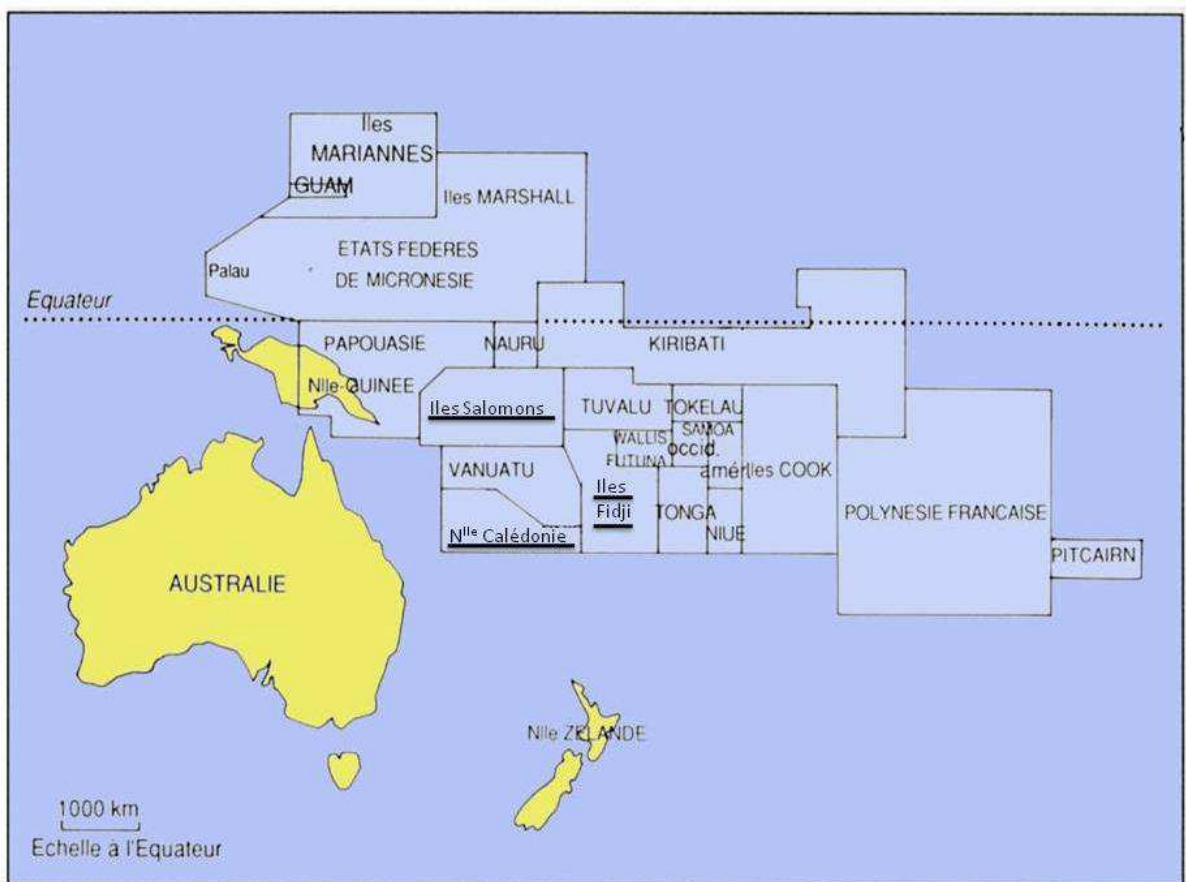


Figure 13 : Carte présentant les états et pays du Pacifique Sud. Les états dont les noms sont soulignés sont concernés par cette étude.

La circulation océanique du Pacifique Sud est caractérisée par de nombreux courants (Figure 14). A l'Ouest, le South Equatorial Current (SEC) longe la côte australienne puis bifurque pour venir alimenter les courants de bord Ouest que sont l'« East Australian Current » (EAC) vers le Sud et le « North Queensland Current » (NQC) vers le Nord. Le SEC est présent entre 30°S et 4°N. Deux contre-courants sont à noter, le « South Subtropical Counter Current » (STCC) visible entre 30°S et 15°S, et le « South Equatorial Counter

Current » (SECC), entre 8°S et 11°S dans le Pacifique Ouest (au niveau des îles Salomon) (Couvelard 2007). Il est également important de noter l'effet des îles sur la circulation océanique et en particulier sur le SEC. Les îles, principalement les îles Fidji, la Nouvelle Calédonie et le Vanuatu, constituent des obstacles topographiques à l'origine de la division du SEC en plusieurs jets zonaux (Couvelard *et al.* 2008)

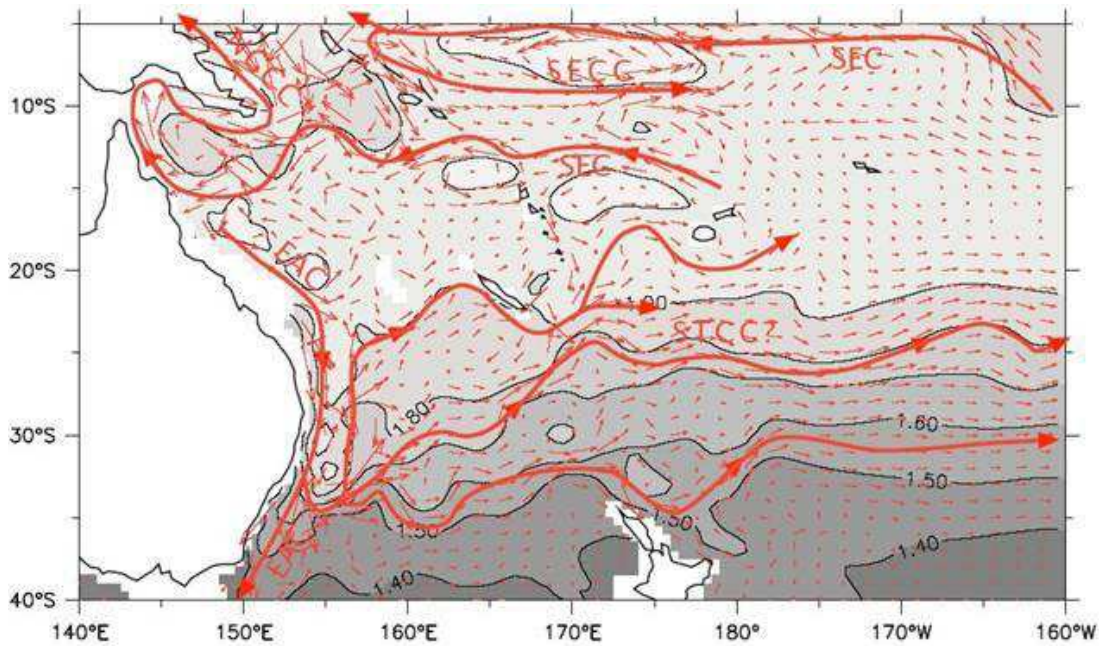


Figure 14 : Circulation océanique moyenne de surface estimée à partir des données climatologiques CARS (CSIRO Atlas of Regional Seas). SEC : Courant équatorial Sud, EAC : Courant Est Australien, SECC : Contre-courant équatorial Sud, STCC : Contre-courant sub-tropical (d'après Kessler in [5]).

La caractéristique principale des îles du Pacifique Sud est la présence de récifs coralliens, comme l'illustre la Figure 15. Les récifs coralliens sont des bioconstructions, c'est-à-dire des zones construites par des êtres vivants tels que les coraux hermatypiques et les algues calcaires, et ayant la capacité de fixer de grandes quantités de carbonate de calcium. La répartition spatiale des récifs coralliens est limitée par un certain nombre de facteurs dont la température, la salinité et l'acidité de l'eau de mer ainsi que la lumière. On observe ainsi une absence de récifs coralliens dans les zones d'upwelling (remontées d'eau froide des profondeurs océaniques) côtiers et aux embouchures des grands fleuves tels que le Gange ou l'Amazone (eaux fluviales douces et boueuses). En effet, les coraux hermatypiques ont une croissance optimale lorsque les températures sont comprises entre 25 et 29°C et la salinité entre 27 et 40 ‰ (Hubbard 1997, Wijsman-Best 1972 in Lasne 2007). Ainsi, les colonies coralliennes ne se développent pas dans les zones où la température hivernale est inférieure à 20°C (Figure 15).

Plusieurs facteurs écologiques déterminent la répartition et la croissance des coraux. Ces facteurs sont : la profondeur, la lumière, la température, la salinité, la sédimentation, la compétition, la prédation, les facteurs hydrodynamiques et atmosphériques (Lasne 2007 pour synthèse). En état de stress, le corail peut expulser ses zooxanthelles, ce qui conduit inévitablement à la mort de l'animal, si le stress perdure. Divers causes peuvent provoquer un stress chez les cnidaires, les plus connues sont : l'augmentation de la température, de l'acidité et de la turbidité de l'eau. Concernant la température, le phénomène de blanchiment intervient lorsque la température des eaux de surface dépasse les 29°C pendant 8 à 12 semaines (Sykes 2007). De plus, les activités humaines, les cyclones, les grandes marées et la prolifération de prédateurs tels que l'étoile de mer *Acanthaster planci* impactent fortement certains récifs du Pacifique Sud.

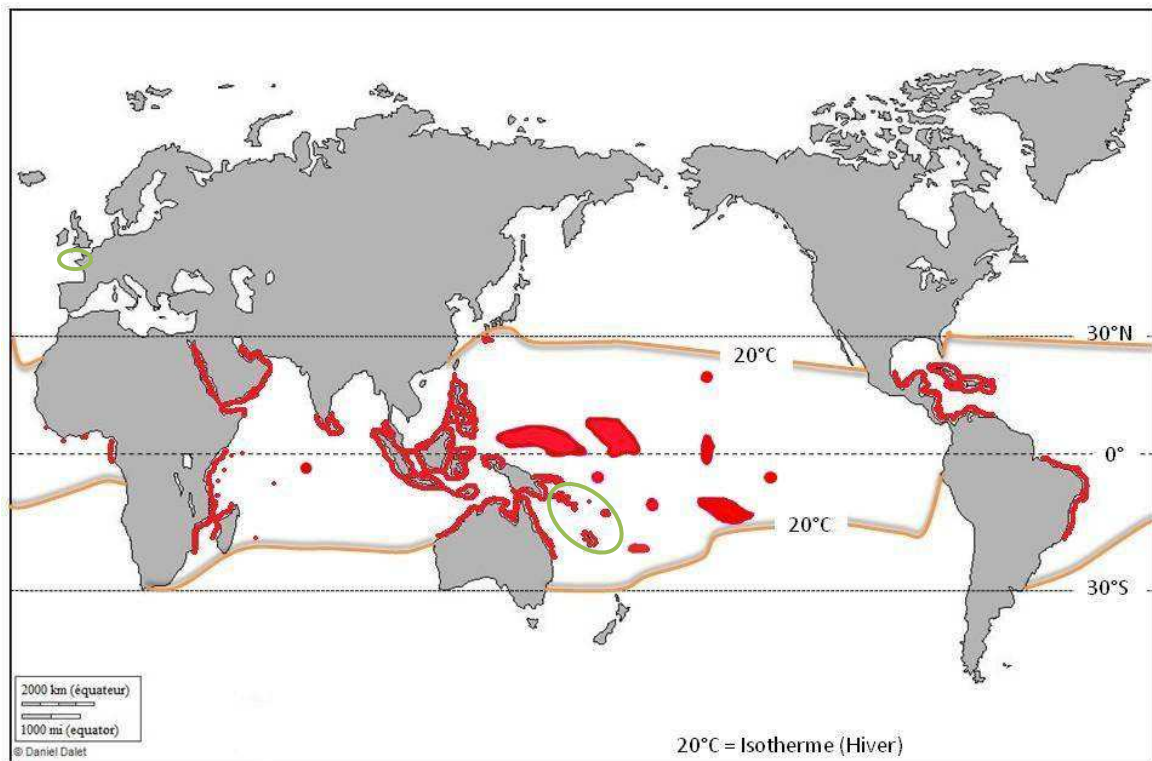


Figure 15 : Répartition des récifs coralliens dans le monde (en rouge). Les lignes oranges délimitent les zones où la température hivernale de l'eau de mer de surface est supérieure à 20°C (d'après Hubbard 1997). Les zones étudiées au cours de ces travaux de thèse sont renseignées par des cercles verts.

Dans certains cas, les pressions sur les récifs coralliens conduisent à la mort des colonies et à un changement irréversible des communautés. Bellwood *et al.* (2004) illustrent ce changement de faciès des récifs coralliens en couplant les conséquences d'un enrichissement en nutriments avec une surpêche des eaux lagunaires qui représentent des stress agissant sur les colonies coralliennes. Si les stress perdurent alors les

colonies coralliennes meurent. Les squelettes calcaires des coraux morts représentent alors des surfaces de substrat libre, rapidement colonisés par diverses espèces opportunistes (gazons, macroalgues, coraux mous...). Un exemple marquant est celui de la Jamaïque où, en 20 ans, la couverture corallienne est passée de 50% à moins de 5% alors que celle des macroalgues, en particulier des *Phaeophyceae* des genres *Sargassum*, *Lobophora*, *Dictyota* et la *Chlorophyceae* *Halimeda* ont atteint 90% (Hughes 1994). Un ensemble de facteurs dont la surpêche, deux ouragans et la diminution de la population des oursins (principaux prédateurs des algues) sont à l'origine de l'installation et la prolifération de ces macroalgues, qui a, ensuite, entraîné une modification durable de la communauté récifale (Hughes 1994).

Au cours de cette étude, les sites visités se situaient tous sur des complexes récifaux appartenant à des îles hautes volcaniques. Le complexe récifal de ces îles comprend typiquement, du rivage vers l'océan diverses zones géomorphologiques (Figure 16) :

- le **récif frangeant**, zone relativement étroite et récente bordant la terre émergée. La sédimentation et la salinité y sont dépendantes de la présence ou non des rivières à proximité ,
- le **lagon**, de plusieurs dizaines de mètre de profondeur et pouvant atteindre plusieurs milles de larges (1 mille nautique = 1,852 km). Cette zone, entre le récif frangeant et le récif-barrière est formée de sédiments meubles et les formations coralliennes s'y répartissent en pâtés ou en pinacles coralliens ,
- le **récif-barrière**, large zone constituée d'un platier interne, d'une crête récifale et d'une pente externe. Le **platier interne** est une zone faisant suite au lagon, moins profonde que celui-ci, elle est horizontale et constituée de formations bio-construites et/ou de débris sédimentaires, parfois importants, arrachés à la pente externe. Les courants n'y sont pas forts et l'intensité lumineuse optimale. Le platier interne présente des topologies très variables (platier à alignements transversaux, compact, à madréporaires, à pâtés dispersés, à microatolls, à herbiers, ...) et peut être interrompu par des passes ,
- la **crête récifale**, étroite zone de front où viennent déferler les vagues. C'est par là que se font les entrées d'eau océanique. Elle est constituée d'une alternance d'éperons et de sillons couverts de blocs et débris ,
- la **pente externe**, partie extérieure immergée du récif. Elle présente une forte déclivité et un fort hydrodynamisme ,
- les **passes**, interruptions dans le récif qui permettent les sorties d'eaux du lagon. Le courant y est fort (8 nœuds) et elles correspondent à des rivières anciennes ,

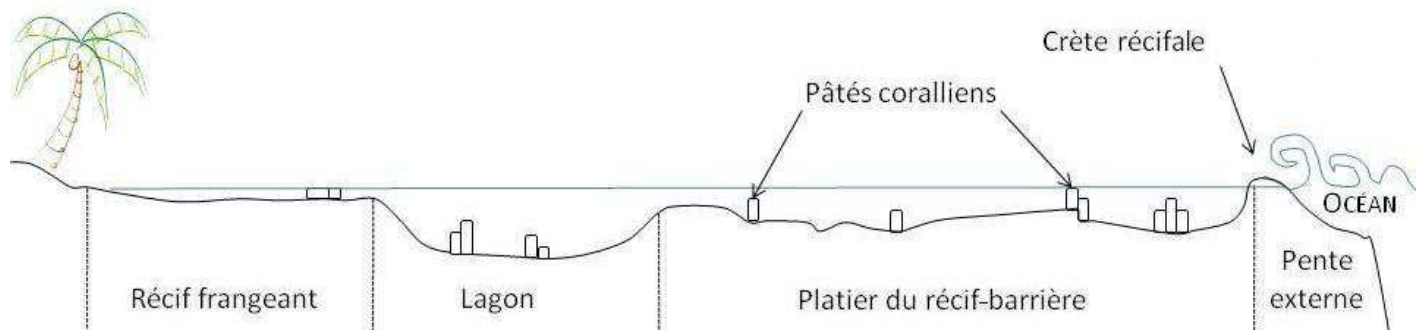


Figure 16 : Coupe schématique du complexe récifal d'une île haute volcanique modifiée d'après Littler et Littler 1994 et Montaggioni 2005.

La situation biogéographique du Pacifique Sud est particulière comme exposé dans l'encadré I-2 ci après.

1.3. Sites étudiés en Bretagne

Afin d'étudier les populations de Sargassaceae tempérées, deux sites ont été sélectionnés sur le littoral finistérien (Figure 18) : l'anse de Porsmeur (N 48°28.871, W 4°46.142) et la Pointe du Diable (N 48°21.255, W 4°33.510). Deux critères ont guidé la sélection de ces deux sites. Tout d'abord, la présence des 3 espèces, une invasive et deux natives, qui co-existent au sein d'un même biotope (cf. §2 - Présentation des modèles biologiques p. 58) et en second lieu la présence de biotopes différents de part la nature du substrat et le mode d'hydrodynamisme. En effet, l'anse de Porsmeur est un site peu soumis à l'action des vagues et de la houle (mode abrité), tandis que la Pointe du Diable présente un mode battu.

1.3.1. La Pointe du Diable

Située sur la commune de Plouzané (Finistère, Bretagne), la Pointe du Diable est un éperon rocheux qui s'avance dans le Goulet de Brest. Le site d'étude est une mare découverte à marée basse de vives et moyennes eaux (coefficient de marée > 70) (Figure 18). Cette mare, située aux pieds de la falaise au niveau de la zone intertidale, est creusée dans la roche et son fond est constitué de débris rocheux de tailles diverses et de débris de coquillages. Ce site est exposé aux forts courants caractérisant le Goulet de Brest, ainsi qu'aux houles d'Ouest à Sud-Ouest. Une grande surface de l'estran rocheux est colonisée par des moules (*Mytilus edulis* Linnaeus). A noter, la présence, en bas du supralittoral et en haut du médiolittoral, du lichen *Lichina pygmaea* (Lightfoot) Agardh, caractéristique des milieux battus.

Encadré I-2 : Situation biogéographique des îles du Pacifique Sud

Les espèces présentes dans l'Océan Pacifique ne sont pas réparties de façon homogène. On observe un gradient de biodiversité de l'archipel Indo-Malais à l'Île de Pâques (figure ci-dessous). Le plus grand nombre d'espèces est observé dans l'archipel Indo-malais, dans une zone baptisée « Triangle d'Or de la biodiversité » délimitée par l'île de Taïwan au Nord, les îles Salomon au Sud-Est et l'île de Sumatra à l'Ouest et incluant une partie des Philippines, de l'Indonésie, de la Malaisie, du Timor Oriental et de la Papouasie Nouvelle-Guinée (Morris 2008). Les coraux hermatypiques (Madrépores) illustrent bien ce gradient de biodiversité de l'Ouest vers l'est du Pacifique Sud. On dénombre ainsi 400 espèces en Indonésie, 170 en Polynésie Française et plus que 6 espèces à l'Île de Pâques. Ce gradient de biodiversité est également visible pour d'autres groupes taxonomiques tels que les Poissons et les macroalgues. L'épicentre de la biodiversité marine se situe au Sulawesi (anciennement îles Célèbes), au cœur du triangle d'or, sur l'équateur. En effet, il existe aussi une répartition des organismes en fonction de la latitude : plus on s'éloigne de la ceinture tropicale, plus le nombre d'espèces diminue. La grande richesse spécifique observée dans cette zone du Pacifique Ouest peut être expliquée par l'histoire géologique, la géographie et les conditions environnementales de la région (Laboute et Richer de Forges 2004). Ainsi les îles Salomon, la Nouvelle Calédonie et les îles Fidji se situent dans la région biogéographique du monde présentant l'une des plus fortes biodiversités marines, alors que la Polynésie française et Clipperton, à l'est, présentent une plus faible biodiversité (Figure 17).

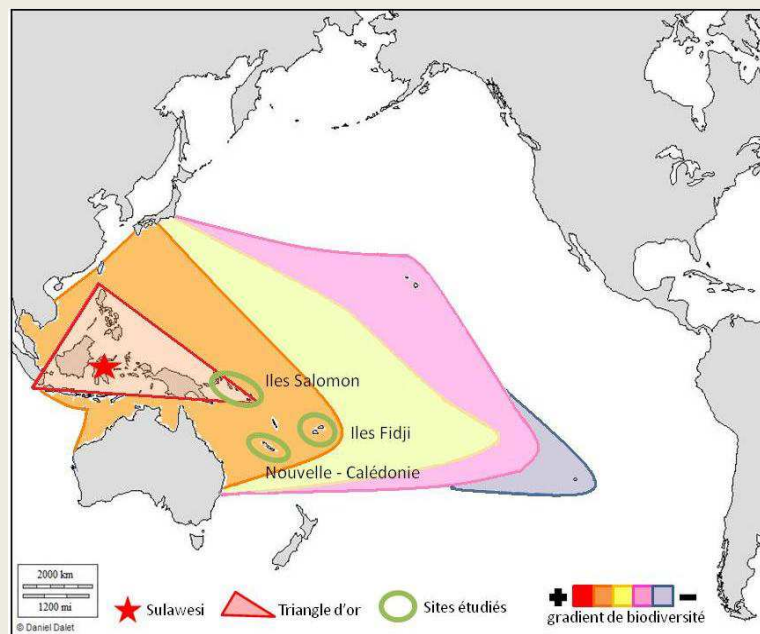


Figure 17 : Gradient de biodiversité dans l'océan Pacifique.

1.3.2. L'anse de Porsmeur

L'anse de Porsmeur est située sur la commune de Porspoder. La présence d'une ceinture à *Ascophyllum nodosum* (Linnaeus) Le Jolis indique que ce site est de mode abrité (Cabioc'h *et al.* 2006). La station d'étude se situe au niveau de la zone intertidale, dans un écoulement, ayant pour origine un ruisseau, protégé des houles et des vagues par une barre rocheuse côté océan et ne découvrant qu'aux marées basses des marées de vives eaux (coefficient de marée > 85) (Figure 18). Le substrat est constitué de sable grossier. Ce site est également caractérisé par la présence de brouteurs de type *Aplysia sp* Linnaeus.

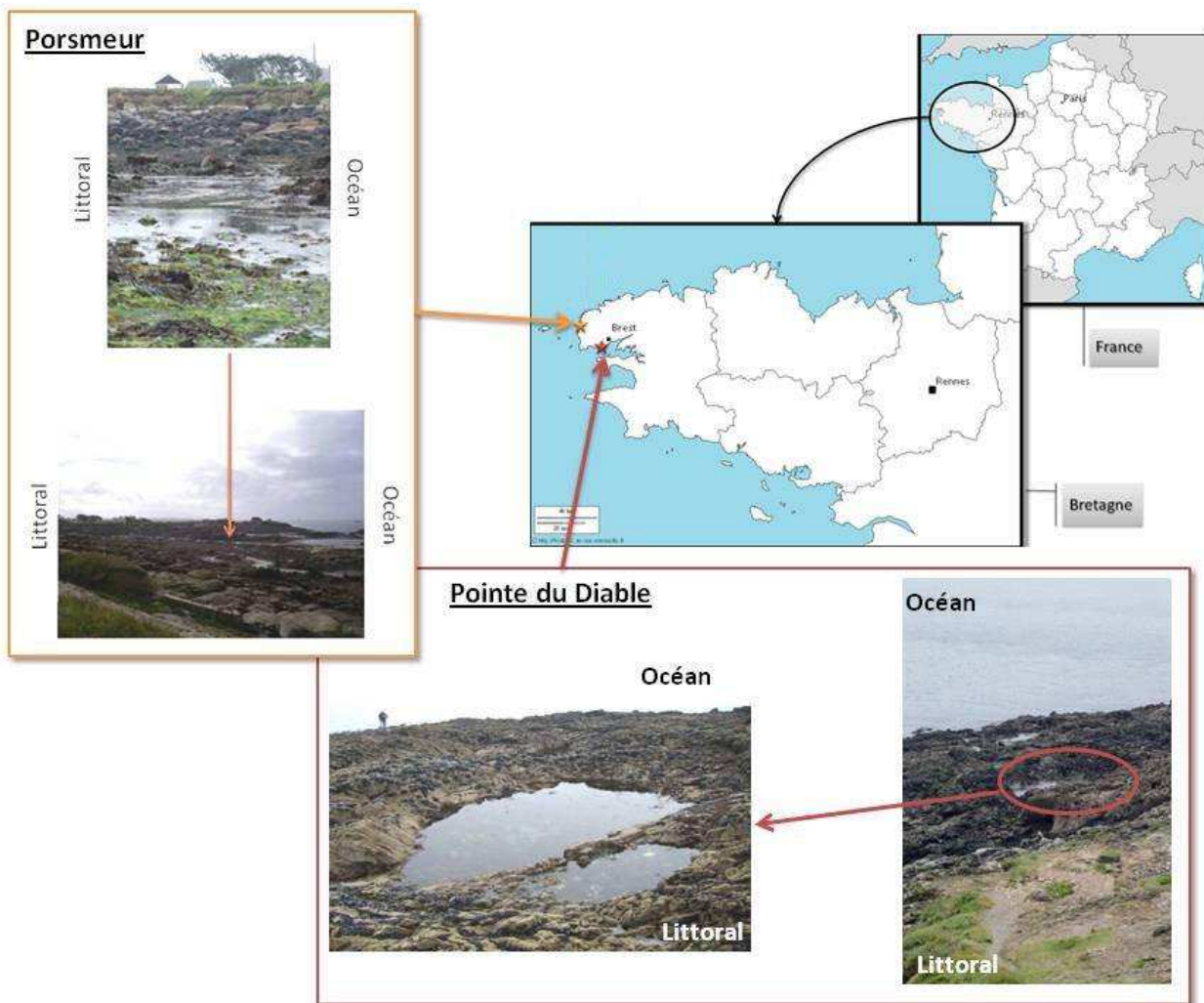


Figure 18 : Emplacement des deux sites d'échantillonnage en milieu tempéré : l'anse de Porsmeur et la Pointe du Diable

1.3.3. Comparaison des deux sites

Les deux sites étudiés ne présentent pas la même richesse en algues. Le site de Porsmeur, abrité, montre une plus forte biodiversité en ce qui concerne les espèces algales (Figure 19).

La mare de la Pointe du Diable est une cuvette encaissée de 2, 50 m de large pour 3, 50 m de long environ. La profondeur de la mare atteint environ 80 cm au centre de la cuvette. Le bord le plus proche du littoral forme une sorte de petite corniche (10 à 20 cm de large) où pousse essentiellement *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt. Le bord de la mare coté océan est formé par une sorte de petit plateau (environ 1 m de large) où se retrouvent entre autre, *Sargassum muticum*, *Cystoseira baccata* (S.G. Gmelin) P.C. Silva, *Bifurcaria bifurcata* R. Ross, quelques *Himanthalia elongata* (Linnaeus) S.F. Gray et des algues rouges de la famille des Corallinaceae. Au centre de la cuvette poussent *Himanthalia elongata*, *Sargassum muticum*, *Cystoseira baccata* ainsi que *Laminaria digitata* (Hudson) J.V. Lamouroux. D'autres espèces d'algues sont présentes, mais ne sont pas dominantes. Les algues rouges et vertes (plusieurs espèces) sont des espèces de petites tailles et essentiellement retrouvées vivant en épiphytes sur les grandes algues brunes (*Sargassum muticum* et *Cystoseira baccata*).

La mare de Porsmeur est un écoulement dû à l'arrivée d'un ruisseau en amont de la plage. La zone d'étude fait 4 m de large pour 6, 50 m de long environ. La profondeur maximale de l'écoulement atteint environ 55 cm au centre de la zone. La mare est protégée des vagues et de la houle par la présence d'une barrière rocheuse haute de 3 m environ le long de son coté océanique. Ce coté de la mare est d'ailleurs caractérisé par une sorte de plateau où domine *Bifurcaria bifurcata*. Les autres espèces se répartissent dans tout l'écoulement. On note cependant une dominance de *Sargassum muticum* le long du bord littoral de la mare. Les espèces du genre *Cystoseira* (*C. baccata* et *Cystoseira tamariscifolia* (Hudson) Papenfuss) ainsi que *Himanthalia elongata* et *Laminaria saccharina* (Linnaeus) J.V. Lamouroux sont retrouvées plus au centre de la mare. Des algues rouges (dont *Chondrus crispus* Stackhouse, *Gracilaria* Greville. et *Furcellaria* J.V. Lamouroux) et des algues vertes (*Enteromorpha* Link in Nees) sont retrouvées dans toute la zone étudiée.

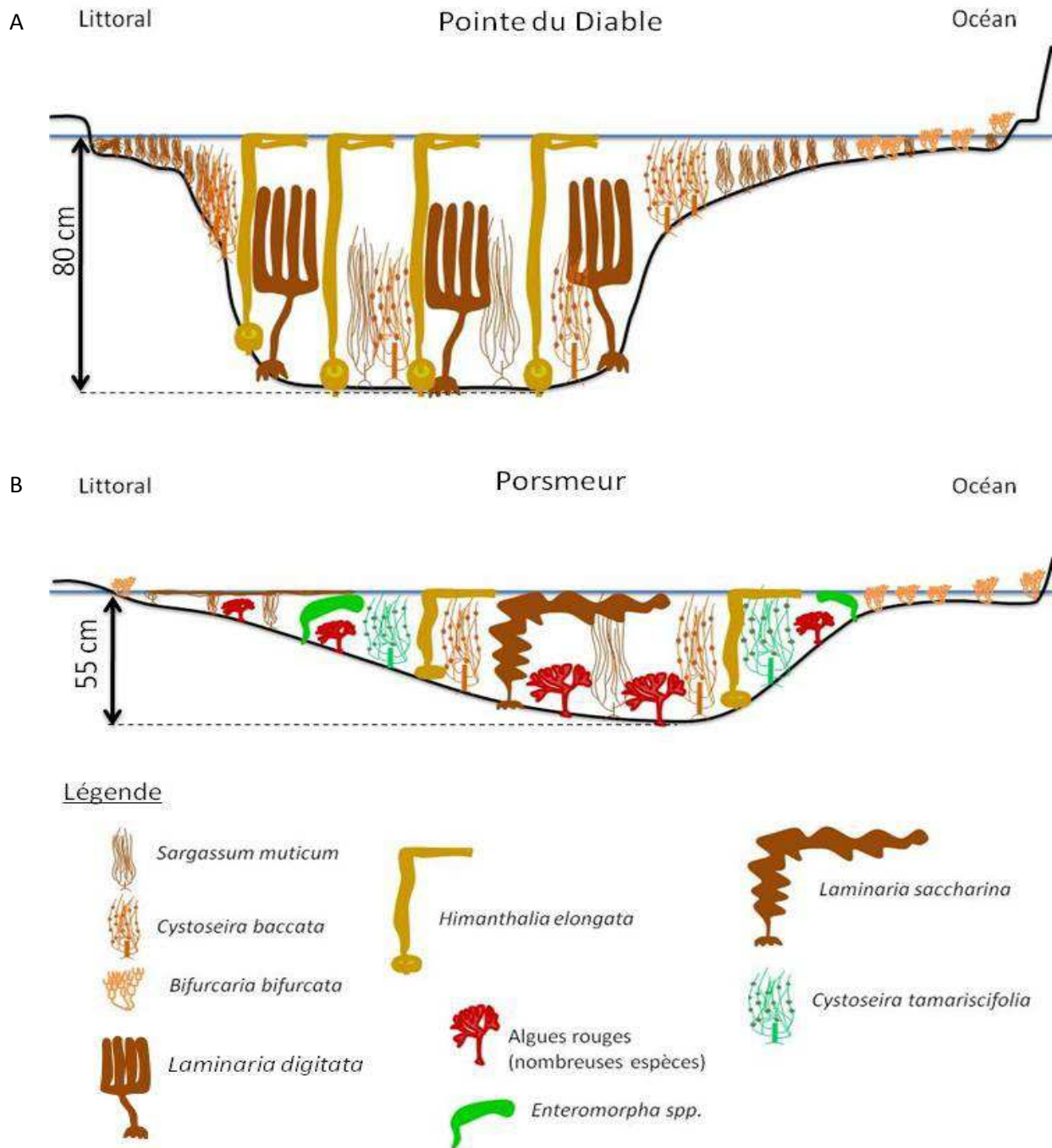


Figure 19 : Schéma de la biodiversité algale dominante des sites étudiés : vue de profil des cuvettes étudiées à La Pointe du Diable (A) et à Porsmeur (B). Les principales espèces d'algues vivant dans ces deux sites sont schématisées de façon qualitative et non quantitative.

1.4.Sites étudiés dans le Pacifique Sud

Dans le Pacifique Sud, trois zones géographiques ont fait l'objet d'une campagne de récolte : les îles Salomon au Nord, la Nouvelle Calédonie au Sud et les îles Fidji à l'est (Figure 20).

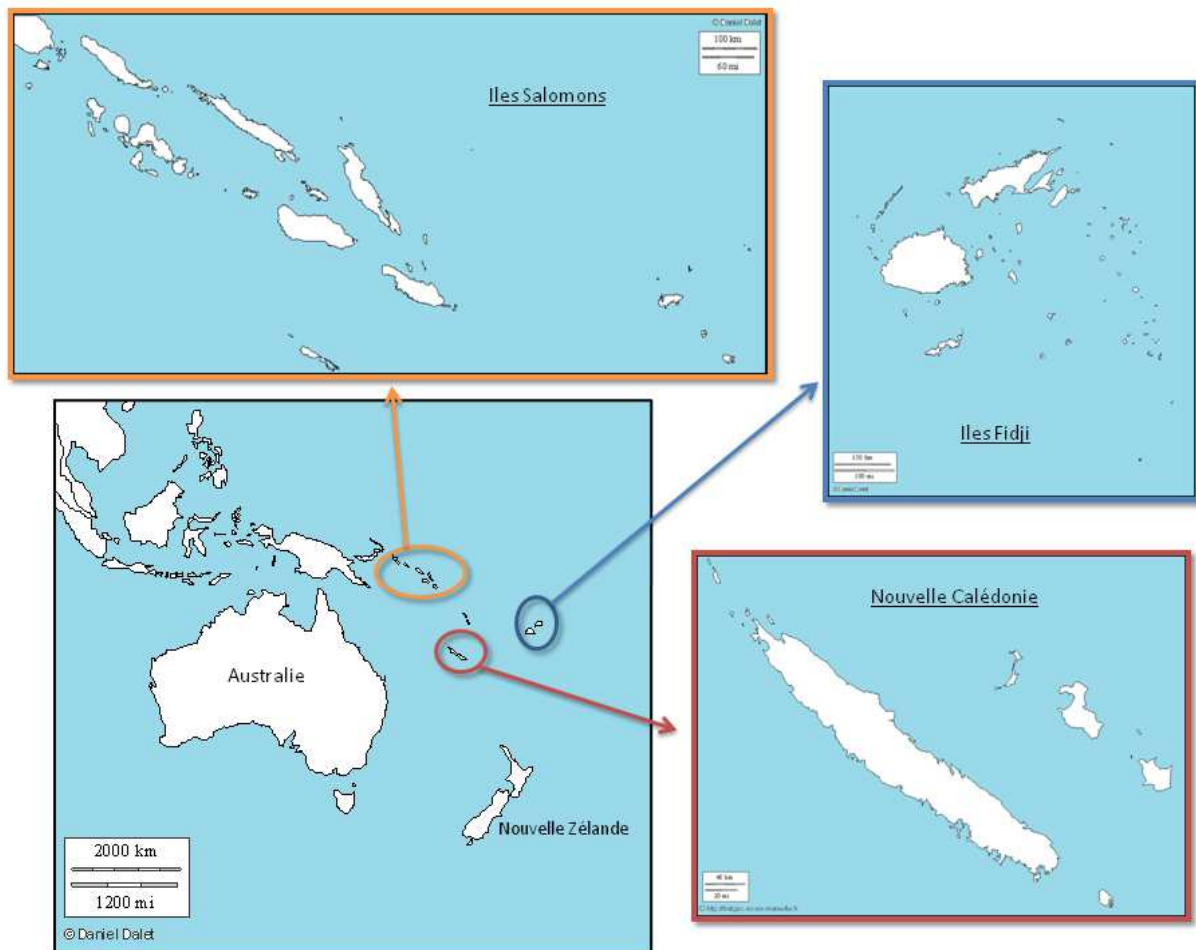


Figure 20 : Emplacement des zones géographiques étudiées dans le Pacifique Sud

Les récifs coralliens de ces trois zones sont en relative bonne santé malgré les événements de blanchiment du corail de 2000 et 2002, qui ont eu pour conséquences une mortalité importante d'une partie des colonies coralliennes et donc une dégradation accrue des récifs des îles Fidji et des îles Salomon (Wilkinson 2006).

1.4.1. Les îles Salomon

Les îles Salomon constituent un état présentant plus d'un millier d'îles réparties sur 27 556 km² entre la Papouasie Nouvelle-Guinée au Nord-Ouest et les îles Vanuatu au Sud-Est. Les îles principales sont Choiseul, Santa Isabel, Malaita, Nggela, Guadalcanal, Rennell, Bellona, San Cristobal, les îles de Nouvelle-Géorgie et les îles Santa-Cruz. Les îles Salomon sont bordées à l'est par l'Océan Pacifique Sud et à l'Ouest par la Mer des Salomon (Figure 21).



Figure 21: Géographie des principales îles des Salomon et situation géographique des sites de prélèvement (soulignés sur la figure).

Les îles Salomon présentent une forte biodiversité marine due à une grande variété d'habitats différents. En effet, les côtes des îles Salomon présentent de nombreuses baies et lagons, des récif-barrières exposés à l'action des vagues mais aussi des mangroves à herbiers de phanérogames. Cette multiplicité d'environnements variés et en bonne santé est rarement observé dans d'autres régions du monde de taille similaire. De part cette forte biodiversité marine (en outre près de 500 espèces de coraux, plus de 1000 espèces de poissons récifaux et 10 espèces de phanérogames), les îles Salomon font partie du « Triangle d'Or » (Encadré I-2).

La récolte de Sargassaceae aux îles Salomon a été effectuée dans cinq milieux (Figure 21) :

- sur l'île de Malaïta : à Lau Lagoon au Nord Ouest et à Anuta Paina situé au Sud-Est,
- sur l'île de Nggela : au Nord Ouest de l'île (site noté NW pour Nord Ouest).

Le Tableau 1 présente les principales caractéristiques des sites de prélèvement.

Tableau 1 : Description des sites de prélèvement aux îles Salomon.

	Localité	Milieu	Mode	Profondeur
MALAITA	Lau Lagoon	Récif-barrière à herbier à phanérogames	agité	1m
	Lau Lagoon	Bord de platier. Zone interne de la passe. Herbier à phanérogames.	calme	1,5 à 3m
	Anuta Paina	Fond corallien	calme	1 à 6m
	Anuta Paina	Zone côtière du platier corallien	agité	1m
NGGELA	Nord-Ouest	Platier frangeant côtier. Haut des rochers. Zone de ressac	+/- agité	0,5 à 0,8 m

Ainsi, à Lau Lagoon, deux sites ont fait l'objet de prélèvement : un premier, situé sur le récif-barrière d'une profondeur d'environ 1 m et constitué d'un herbier à phanérogames. Ce site est aussi caractérisé par la présence d'un hydrodynamisme fort. Le second site de prélèvement de Lau Lagoon se situe sur le bord du platier, dans la zone interne de la passe. Il s'agit là aussi d'un herbier à phanérogames caractérisé par un faible hydrodynamisme et une profondeur d'1,5 m à 3m.

De même à Anuta Paina, deux sites ont fait l'objet de prélèvement. Un premier site caractérisé par un fond corallien, un hydrodynamisme faible et une profondeur de 1 à 6 m. Le second site est localisé sur la zone cotière du platier corallien, il est caractérisé par un plus fort hydrodynamisme et une plus faible profondeur (de l'ordre d'un mètre).

A Nggela, un seul site au Nord Ouest de l'île, a fait l'objet d'une visite. Il s'agit d'une zone située sur le platier frangeant, sur le haut de rochers. Ce site est caractérisé par un hydrodynamisme important (il s'agit d'une zone de ressac) et d'une faible profondeur (moins d'un mètre).

1.4.2. La Nouvelle Calédonie

La Nouvelle Calédonie, intégrée à la Mélanésie, est située à 1 500 km à l'Est de l'Australie et à 1700 km au Nord-Ouest de la Nouvelle Zélande. L'archipel, d'une superficie de 18 575 km², comprend différentes îles parsemées dans un espace maritime de 1 740 000 km². Il comprend une île principale, la Grande Terre (500 km de long et 60 km de large), des îles périphériques telles l'île des Pins au Sud, les îles Loyauté (principalement Ouvéa, Lifou et Maré) à l'Est et les îles Beleps au Nord (Figure 22), ainsi que de vastes ensembles coralliens représentés par les récifs d'Entrecasteaux au Nord des îles Beleps, le plateau corallien des Bellona-Chesterfield-Bampton, à l'Ouest, à mi-chemin de l'Australie et les formations récifales de la Corne Sud au Sud. La Nouvelle Calédonie cumule 24 000 km² de lagons, dont 19 000 km² autour de la Grande Terre. Ce lagon est considéré comme le plus grand du monde. La Grande Terre est entourée par environ 1 600 km de récif linéaire continu (Andréfouët et Torres-Pulliza 2004), classé au Patrimoine Mondial de l'UNESCO en 2008, soit la deuxième plus grande barrière de corail au monde après celle de l'Australie. L'aire récifale totale de la Nouvelle Calédonie est estimée à près de 4 538 km² (Andréfouët 2006 in Lasne 2007).

La géomorphologie du lagon et des récifs néocalédoniens est à l'origine d'une grande diversité d'habitats et de communautés benthiques. Andréfouët *et al.* 2007 considèrent la Nouvelle Calédonie comme une région présentant une des diversités récifales les plus complexes au monde. Neuf formes principales de récifs sont répertoriées en Nouvelle Calédonie : des récifs frangeants, des récif-barrières simples, des doubles récif-barrières, rares au niveau mondial, des lagons plus ou moins profonds, des atolls surélevés, des récifs coralliens en patch (isolés), des récifs soulevés et des récifs immergés ainsi que des îlots coralliens.

La végétation marine se compose d'herbiers et d'algues. On trouve 12 espèces de plantes marines, essentiellement sur les fonds sablo-vaseux des lagons peu profonds et des calanques. Parmi les macroalgues marines, 46 familles représentant 322 espèces ont été dénombrées mais il s'agirait là d'une sous-estimation (Mattio 2008). Concernant les espèces animales, 5 055 espèces marines ont été décrites, dont 1 695 poissons de 199 familles, 900 cnidaires (coraux, méduses), 841 crustacés, 802 mollusques, 254 échinodermes (étoiles

de mer, concombres de mer, etc.), 220 ascidies, 203 vers, 151 éponges, 14 serpents marins, 4 tortues et 22 mammifères marins (Rapport de l'UICN, 2008).

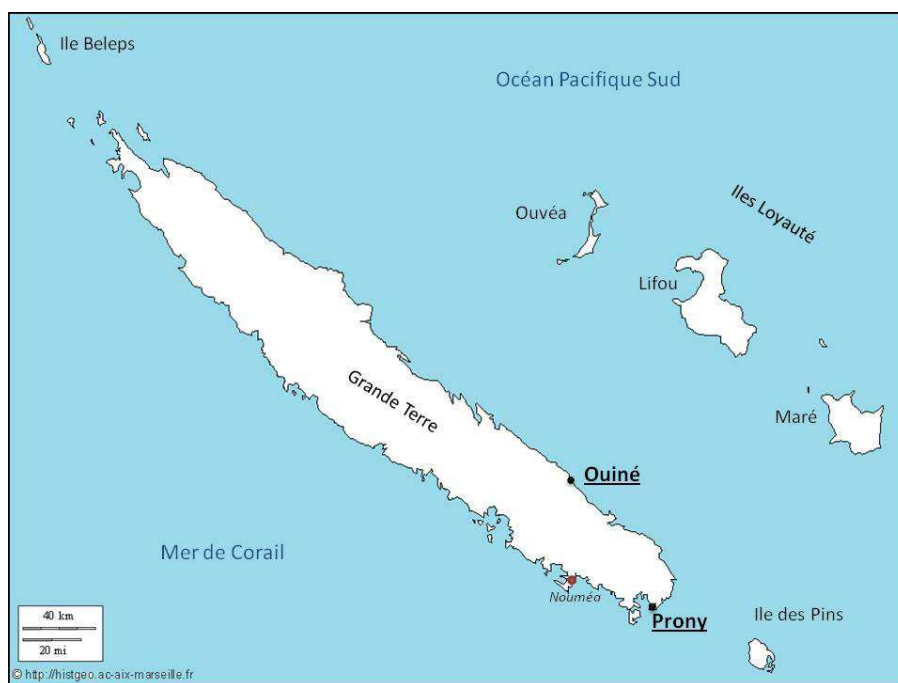


Figure 22. : Géographie des principales îles néocalédoniennes et situation géographique des sites de prélèvement (soulignés).

Seule la Grande Terre a été échantillonnée lors de la campagne de prélèvement. Les Sargassaceae ont été prélevées dans trois milieux, à Prony1 et 2 au Sud et à Ouiné au Sud-Est (Figure 22). Le Tableau 2 apporte des informations supplémentaires sur ces sites de prélèvement.

Tableau 2 : Description des sites de prélèvement situés sur la Grande Terre en Nouvelle Calédonie

Localité	Milieu	Mode	Profondeur
Prony 1	Tombant du platier corallien frangeant	+/- agité	6
Prony 2	Platier corallien frangeant	+/- agité	1 à 2 m
Ouiné (Baie du Cap Tonnedu)	Platier corallien frangeant, forte influence terrigène	+/- agité	1 à 2 m

A Prony, deux stations ont fait l'objet de prélèvement. La première est située sur le tombant du platier corallien du récif frangeant, à environ 6 m de profondeur. La seconde est également située au niveau du platier corallien du récif frangeant, mais dans une zone moins profonde, à environ 1,5 m de la surface.

Le site de prélèvement d'Ouiné (en baie du Cap Tonnedu) est situé sur le platier du récif frangeant et est caractérisé par une forte influence terrigène. Ce site est à environ 1,5 m de la surface.

1.4.3. Les îles Fidji

Les îles Fidji constituent un État insulaire situé au Nord-est de la Nouvelle-Zélande, à 1 400 km à l'est de la Nouvelle Calédonie. Les îles Fidji forment un archipel de 18 376 km² composé de 844 îles, îlots et atolls, dont une centaine seulement est habitée. Les deux îles principales sont au Nord-est Vanua Levu et au Sud-Ouest Viti Levu (Figure 23), elles représentent à elles seules 87 % de la superficie totale du pays. Les autres îles importantes sont Taveuni, Kadavu, Ovalau, Ngau, et Koro. L'archipel présente deux mers « intérieures » : la Mer de Bligh, entre l'archipel des Yasawa, Viti levu et Vanua Levu, et la Mer de Koro, entre Viti Levu, Vanua Levu et les archipels de îles Lau (Figure 23.).

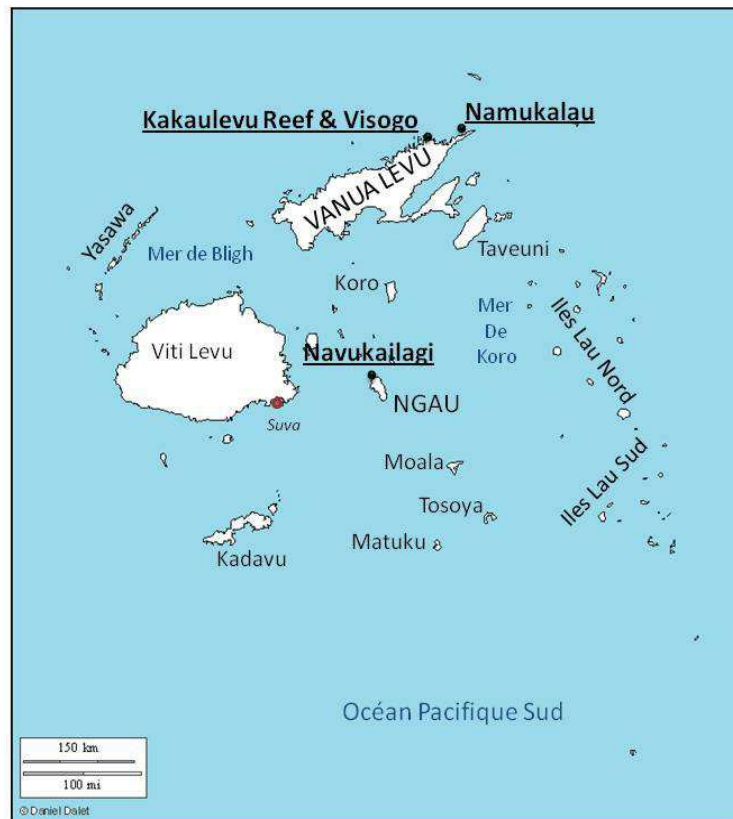


Figure 23. : Géographie des principales îles des Fidji et situations géographiques des sites de prélèvement (soulignés).

Les îles Fidji montrent une grande variété de récifs coralliens. Néanmoins, la surpêche et l'eutrophisation des eaux lagunaires, due à l'augmentation de populations humaines au sein de l'archipel (résidents et touristes) affaiblissent les coraux. A la surpêche et à l'eutrophisation des eaux, s'ajoutent les cyclones et tempêtes ainsi que l'augmentation de la température des eaux de surface. En 2000, un important événement de blanchiment des coraux a eu lieu, consécutif à des températures des eaux de surface supérieures à 29°C pendant plus de 8 semaines (Sykes 2007).

La récolte de Sargassaceae a été effectuée dans quatre milieux (Figure 23) :

- à Kakaulevu reef , Visogo et Namukalau situés au Nord-est de l'île Vanua Levu
- à Navukailagi situé au Nord-Ouest de l'île Ngau

Le Tableau 3 donne les principales caractéristiques des sites de prélèvement aux îles Fidji.

Sur l'île de Vanua Levu, 3 sites ont fait l'objet de prélèvements : à Kakaulevu-reef, Visogo et au large de Namukalau. Kakaulevu-reef est situé sur la pente interne du récif-barrière au niveau d'un platier corallien constitué de dalle et de sable grossier avec des patches de madrépores. Ce site est localisé entre 2 et 3 m de profondeur.

Tableau 3 : Description des sites de prélèvement aux îles Fidji

	Localité	Milieu	Mode	Profondeur
VANUA LEVU	Kakaulevu reef	Pente interne du récif-barrière, Platier corallien de dalle et sable grossier avec patch de madrépores	calme	2 à 3 m
	Visogo	Platier frangeant de sable vaseux avec couverture de phanérogames (herbier) et quelques zones de blocs coralliens détritiques portant de grandes Sargasses	calme	0,5 à 1 m
	Namukalau	Lagon (platier intermédiaire) de sable vaseux avec forte couverture de phanérogames (herbier) et quelques zones de blocs coralliens détritiques portant de grandes Sargasses	calme	1 à 2 m
NGAU	Navukailagi	Platier côtier devant le village, bord de mangrove : platier envasé avec blocs détritiques et bordure corallienne.	calme	0,5 à 1 m

Visogo est situé au niveau d'un récif frangeant. Ce site est caractérisé par du sable vaseux, un herbier à phanérogames, quelques zones de blocs coralliens détritiques portant de grands individus de *Sargassum* C. Agardh et positionné à une profondeur de 0,5 à 1 m.

Le site au large de Namukalau se situe dans le lagon, au niveau du platier intermédiaire. Il est dans une zone plus profonde que le premier (entre 1 à 2 m de profondeur) mais est constitué, comme le premier site, de sable vaseux, d'un herbier à phanérogames et de quelques zones de blocs coralliens détritiques portant de grands individus de *Sargassum*. Sur l'île de Ngau, un seul site a fait l'objet de prélèvement. Il s'agit d'un site de bord de mangrove, devant un village proche de Navukailagi, sur le platier côtier du récif. Ce platier est envasé et constitué de blocs détritiques et d'une bordure corallienne. Le site est proche de la surface, entre 0,5 et 1 m de profondeur.

2. Présentation des modèles biologiques

2.1. Position taxonomique et richesse spécifique de la famille des Sargassaceae

Les Phaeophyceae, ou Algues Brunes, constituent un ensemble monophylétique classé dans le règne des Chromista (cf. introduction générale), le sous-règne des Chromobiota, l'infrarègne des Heterokonta (aussi appelé Stramenopiles) et l'embranchement des Ochrophyta (d'après Cavalier-Smith (1998, 2004) et Phillips *et al.* (2008a)). Au sein des Phaeophyceae, la famille des Sargassaceae *sensu lato* (*sensu* De Toni 1895) appartient à l'ordre des Fucales (Rousseau *et al.* 2001, Cho *et al.* 2006, Phillips *et al.* 2008b). La classification des Sargassaceae au sein des êtres vivants est résumée dans le Tableau 4 et les relations phylogénétiques au sein des Phaeophyceae sont illustrées sur la Figure 24.

Durant la dernière décennie, de nombreuses études phylogénétiques (Rousseau *et al.* 1997, Rousseau et De Reviers 1999, Rousseau *et al.* 2001, Cho *et al.* 2006, Phillips *et al.* 2008a) ont permis de mieux appréhender les relations phylogénétiques au sein des Phaeophyceae (Figure 32.). Ainsi, 8 familles sont couramment reconnues dans l'ordre des Fucales (Cho *et al.* 2006). Les résultats reportés par Phillips *et al.* (2008a) suggèrent que les Sargassaceae et les Fucaceae sont des familles ayant dérivées/émergées relativement récemment dans l'histoire de l'évolution. De récents remaniement taxonomiques ont conduit Rousseau et De Reviers (1999) à inclure le groupe paraphylétique des Cystoseiraceae dans la famille des Sargassaceae *sensu lato*. Ce remaniement a ensuite été validé par d'autres études moléculaires (Rousseau *et*

al. 2001, Cho *et al.* 2006, Phillips *et al.* 2008) qui ont montré que les Sargassaceae et les Cystoseiraceae présentent des morphologies similaires et forment au niveau moléculaire un clade fortement monophylétique (Rousseau et De Reviers 1999, Rousseau *et al.* 2001, Cho *et al.* 2006).

Tableau 4 : Classification des Sargassaceae dans l'arbre de la vie (d'après De Reviers 2003a, De Reviers 2003b, Cavalier-Smith 2004, Phillips *et al.* 2008a, Phillips *et al.* 2008b, Guiry et Guiry 2009).

Empire	Eucaryote
Super-groupe	Chromalveolates
Règne	Chromista
Sous-règne	Chromobiota
Infra-règne	Hétérokonta (= Stramenophiles)
Embranchement	Hétérokontophyta (=Ochrophyta)
Classe	Phaeophyceae
Ordre	Fucales
Famille	Sargassaceae

La famille des Sargassaceae montre une forte diversité. En effet, d'après Guiry et Guiry (2009), 488 espèces de Sargassaceae ont été recensées à ce jour. En nombre d'espèces, les Sargassaceae représentent ainsi 92% des espèces connues au sein de l'ordre des Fucales qui comptent 528 espèces à ce jour. La famille Sargassaceae est divisée en 26 genres dont le plus important, en nombre d'espèces, est le genre *Sargassum* avec 352 espèces décrites dont la majorité sont des espèces benthiques. Néanmoins, 2 espèces du genre *Sargassum*, *S. fluitans* (Børgesen) Børgesen et *S. natans* (Linnaeus) Gaillon, ont la particularité d'être des espèces holopellagiques. Ces deux dernières espèces ont donné son nom à la Mer des Sargasses (zone de l'Atlantique-Ouest, au Nord de la mer des Caraïbes). Seules des espèces benthiques seront étudiées ici.

La famille Sargassaceae est cosmopolite et possède des représentants dans la quasi-totalité des mers du globe à l'exception des Océans Arctique et Antarctique. Les genres qui nous ont intéressés lors de ce travail de thèse illustrent d'une part ce caractère cosmopolite des Sargassaceae et d'autre part la diversité qui existe au sein de cette famille.

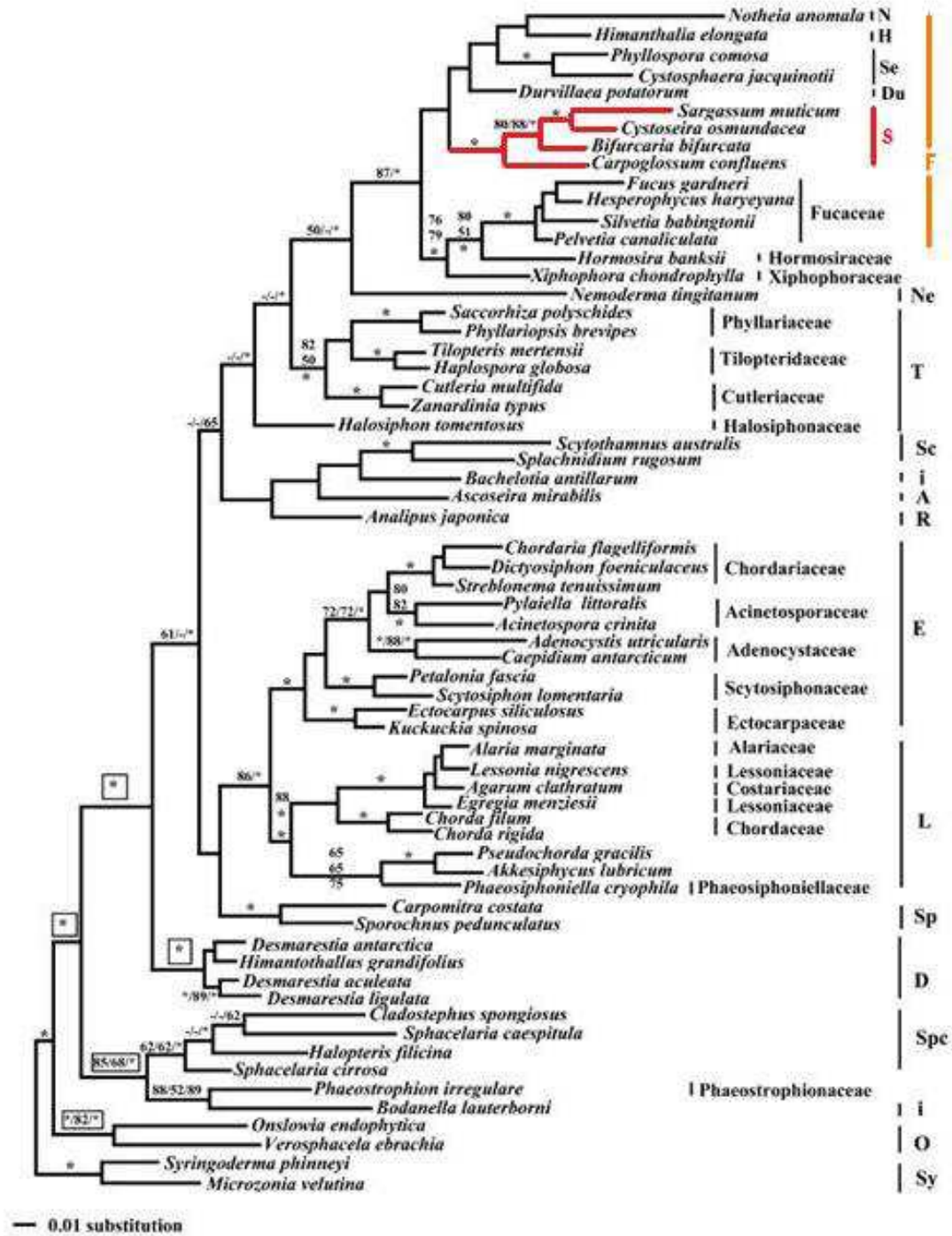


Figure 24 : Position de la famille des Sargassaceae au sein des Phaeophyceae, d'après une reconstruction phylogénétique Bayésienne basée sur l'alignement de séquences *rbcL* représentant les ordres et familles de la classe des Phaeophyceae (d'après Phillips *et al.* 2008a). A, Ascoseirales, D, Desmarestiales, Du, Durvillaeaceae, E, Ectocarpales, F, Fucales, i, *incertae sedis*, H, Himanthaliaceae, L, Laminariales, N, Notheiaceae, Ne, Nemodermatales, O, Onslowiales, R, Ralfsiaceae, S, Sargassaceae, Sc, Scytothamnaceae, Se, Seirococcaceae, Sp, Sporochneales, Sphacelariales, Sy, Syringodermatales, T, Tilopteridales.

2.2.Importances écologique et économique

Les Sargassaceae sont écologiquement importantes, en effet, certaines espèces structurent les habitats benthiques et pélagiques (Kilar *et al.* 1992), d'autres jouent un rôle majeur voire essentiel dans le cycle de vie de différentes espèces marines en leur apportant substrat, nourriture et protection contre les conditions environnementales difficiles (dessiccation, hydrodynamisme...) et la prédation (Rossier et Kulbicki 2000, Godoy et Coutinho 2002). La canopée algale formée par les Sargassaceae est également un milieu qui abrite une grande diversité d'invertébrés (amphipodes, polychètes, mollusques...) et qui joue le rôle de nurseries pour de nombreuses espèces de poissons (Barrabe 2003 in Mattio 2008, Tanaka et Leite 2004, Aburto-Oropeza *et al.* 2007). A titre d'exemple, en Nouvelle-Calédonie, à surfaces équivalentes, il y aurait quatre fois plus de mollusques et de crustacés dans les algueraies à sargasses que dans les herbiers de Magnoliophytes marines (Barrabe 2003 in Mattio 2008).

De plus, il existe des espèces pélagiques de Sargassaceae. Ainsi, les populations de *Sargassum fluitans* (Børgesen) Børgesen et *Sargassum natans* (Linnaeus) Gaillon forment un habitat pélagique unique où viennent se reproduire les anguilles telles que l'anguille européenne, *Anguilla anguilla* (Linnaeus), et l'anguille américaine, *Anguilla rostrata* (Le Sueur) (Schoth et Tesch 1982, Bonhommeau *et al.* 2008).

Certaines espèces de Sargassaceae ont la particularité de présenter de fortes **biomasses et donc gêner certaines activités, telles le tourisme, la navigation ou l'aquaculture**. C'est par exemple le cas de *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt. En effet les populations Nord atlantiques et méditerranéennes de cette espèce peuvent provoquer des nuisances qui concernent principalement les domaines (i) de la navigation avec l'enroulement des thalles de *S. muticum* dans les hélices ou bien encore l'obstruction des canaux de navigation, (ii) de l'aquaculture où la prolifération de l'algue rend difficile l'entretien et l'accès aux parcs ostréicoles, occasionnant ainsi un retard dans la mise en place des naissains, et de ce fait un retard sur les ventes et (iii) le milieu de la pêche où la présence de *S. muticum* entraîne un alourdissement et la paralysie des engins de pêche.

Les Sargassaceae peuvent aussi constituer un revenu économique non négligeable, en particulier dans divers pays asiatiques où certaines espèces sont exploitées pour les industries textile et agroalimentaire (Prud'homme van Reine 2002) ou consommées directement, comme c'est le cas de *Sargassum fusiforme* (Harvey) Setchell, connu auparavant sous le nom d'*Hizikia fusiformis* (Stiger *et al.* 2000), en Asie. L'algue est ainsi récoltée (Figure 25A), lyophilisée puis conditionnée en sachet (Figure 25B)



Figure 25 : A - Récolte de *Sargassum fusiforme* (initialement connue sous le nom d'*Hizikia fusiformis*) pour la consommation humaine au Japon (Sotogawa-cho, Choshi, Chiba Prefecture). Photographie Hideki Haga (Guiry et Guiry 2009). B – Conditionnement de *Sargassum fusiforme* vendu sous le nom d'Hiziki.

De nombreuses études ont également montré, chez certaines espèces de Sargassaceae, la présence de molécules actives qui intéressent les industries cosmétique et pharmaceutique (Smit 2004, Mayer *et al.* 2007, Mayer *et al.* 2009 pour review). Quelques exemples de molécules isolées d'espèces de Sargassaceae, plus particulièrement du genre *Sargassum*, sont illustrées à la Figure 26.

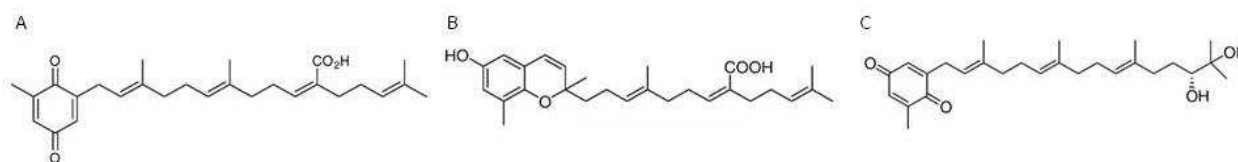


Figure 26 : (A)-Acide sargaquinoïque isolé de *Sargassum macrocarpum* (B)-Plastoquinone isolée de *Sargassum micracanthum* et ayant une action antivirale contre le cytomégalovirus et le virus de la rougeole (Mayer et al, 2009) (C)- Sargochromol isolé de *Sargassum macrocarpum* et ayant un effet neuroprotecteur sur les cellules nerveuses PC12D (Mayer *et al.* 2009).

Ainsi, deux molécules ont été isolées de *Sargassum macrocarpum* : l'acide sargaquinoïque et le sargochromol qui présentent toutes deux un effet neuroprotecteur sur les cellules nerveuses PC-12D (Mayer *et al.* 2007). Enfin, la plastoquinone isolée de *Sargassum micracanthum* possède une action antivirale contre le cytomégalovirus (virus responsable de l'infection fœtale congénitale la plus fréquente dans les pays industrialisés, avec des conséquences neurologiques plus ou moins sévères chez l'enfant à naître) et le virus de la rougeole (Mayer *et al.* 2009).

2.3.Reproduction et cycle de développement

Comme tout taxon appartenant à l'ordre des Fucales, les espèces de la famille Sargassaceae sont représentées par une génération unique qui se reproduit par libération de gamètes haploïdes. Le cycle de développement est donc monogénétique diplophasique (Figure 27).

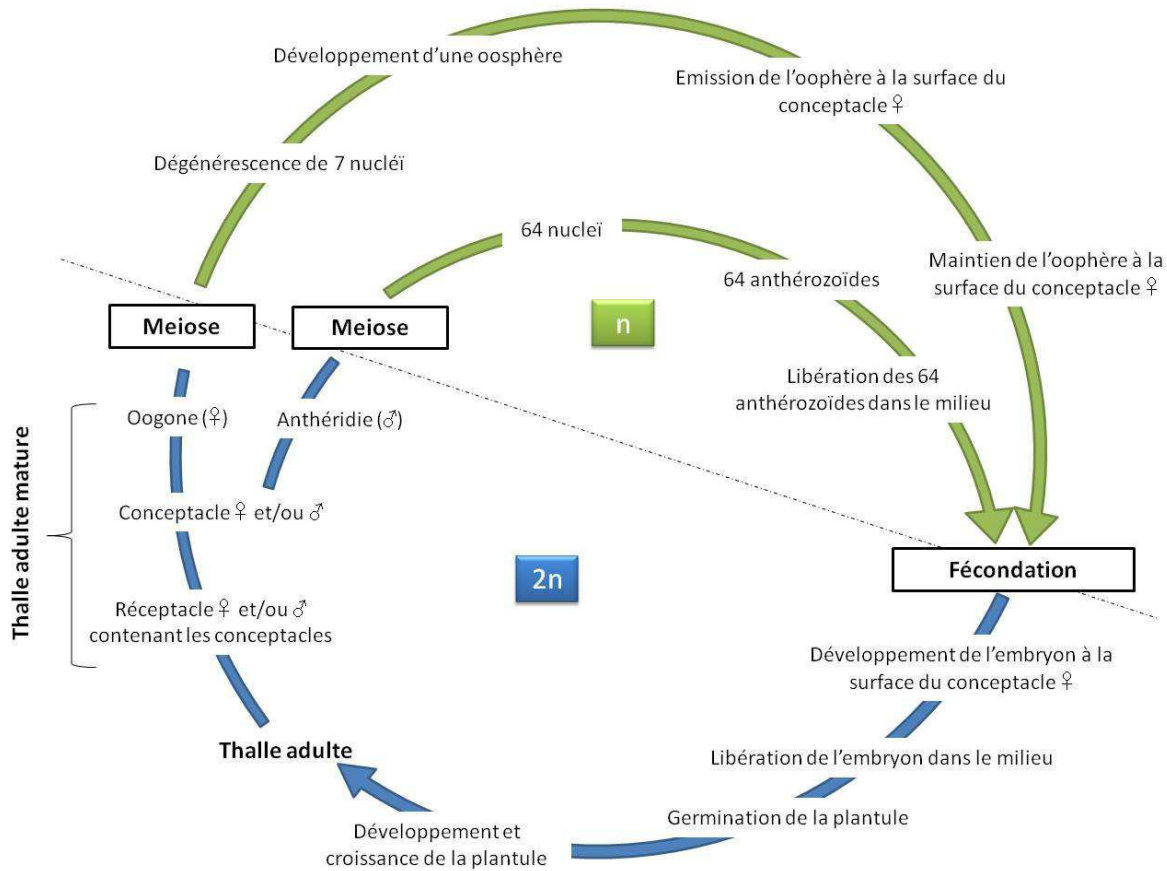


Figure 27 : Cycle de développement des espèces monoïques appartenant à la famille Sargassaceae (cycle monogénétique diplophasique) d'après Stiger (1997) et De Reviers (2006). Les espèces dioïques présenteront des individus mâles et femelles séparés.

Suivant les espèces, cette génération peut persister sur le substrat, on parle alors d'espèce pérenne, ou alors disparaître, on parle alors d'espèce annuelle. Parmi les espèces pérennes, on distingue les hémiphanérophytes et les hémicryptophytes *sensu* Feldmann (1937), dans le cas où une seule une partie de la plante est pérenne : il s'agit du système de fixation dans le cas des hémicryptophytes, et de l'axe principal

avec ou sans une partie des rameaux, dans le cas des hémiphanérophytes. A la saison suivante, quelle que soit la partie perdue, l'algue la régénère.

Les individus adultes sont monoïques ou dioïques, ce sont des meiosporophytes ($2n$ chromosomes) qui produisent des gamètes par réduction chromatique. Les gamètes sont produits dans des conceptacles qui sont des cryptes pilifères fertiles. Les conceptacles sont regroupés en réceptacles aux apex des latérales fertiles chez les genres *Cystoseira* et *Bifurcaria*, et à la base des pleuridies tout au long de l'axe chez le genre *Turbinaria* et le long des latérales fertiles chez le genre *Sargassum*. A maturité, les oogones contenus dans les conceptacles femelles produisent par division chromatique suivie d'une mitose 8 nucléi. Chez les Sargassaceae *Sensu stricto*, seul un de ces 8 nucléi se développe pour donner une oosphère (gamète femelle). La formation des anthérozoïdes (gamètes mâles) suit le même schéma. Au sein d'une anthéridie, les 4 noyaux haploïdes issus de la réduction chromatique subissent quatre mitoses, ce qui aboutit, *in fine*, à la formation de 64 anthérozoïdes par anthéridie. Les anthérozoïdes sont ensuite expulsés dans le milieu alors que l'oosphère, après rupture de la paroi de l'oogone, reste à la surface du conceptacle. Les anthérozoïdes se déplacent vers l'oosphère par chimiotactisme, attirés par la fucoserratène, phéromone excrétée par les oosphères (De Reviers 2003a). Après fusion des gamètes, les zygotes se forment à la surface des réceptacles (Yoshida, 1983). Les zygotes germent pour donner des plantules portant 8 à 16 rhizoïdes, qui une fois libérées, sédimentent rapidement et se fixent à un substrat dur, généralement à proximité du thalle parental (Stiger et Payri 1999).

2.4. Distribution géographique et richesse spécifique des genres étudiés

Dans ce travail de thèse, quatre genres à répartition géographique différente ont été étudiés. Les genres *Sargassum* et *Cystoseira* présentent les distributions les plus étendues alors que les genres *Bifurcaria* et *Turbinaria* sont plus restreints géographiquement (Figure 28).

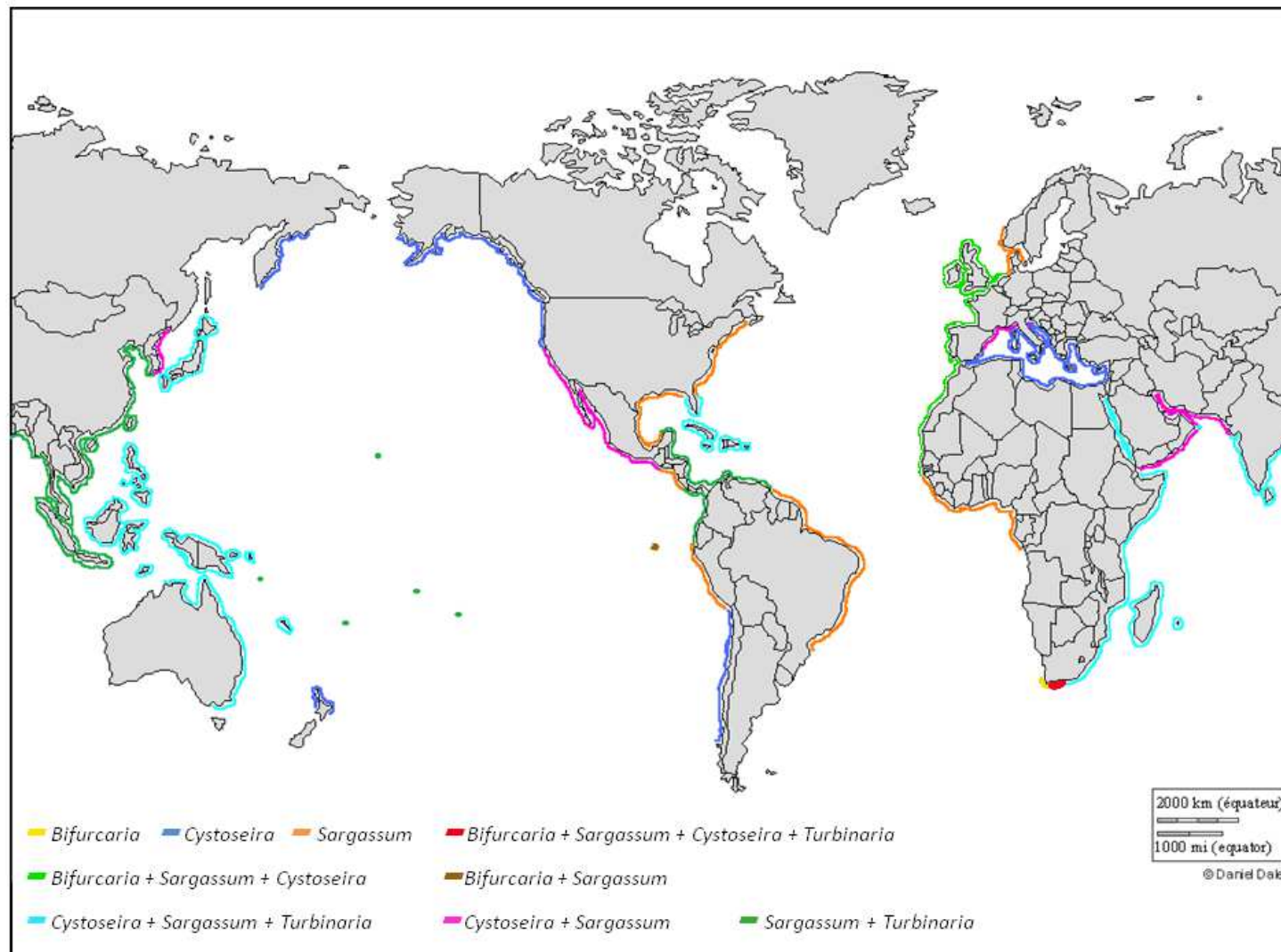


Figure 28 : Répartition mondiale des 4 genres de Sargassaceae étudiés : *Bifurcaria*, *Cystoseira*, *Sargassum* et *Turbinaria* (reconstituée d'après Guiry et Guiry 2009).

2.4.1. *Bifurcaria*

Le genre *Bifurcaria* est peu différencié avec seulement 3 espèces recensées, qui sont des espèces endémiques de leur région. Ainsi, *Bifurcaria galapagensis* (Piccone & Grunow) Womersley est endémique des îles Galapagos (Womersley 1964), *Bifurcaria brassicaeformis* (Kützinger) Barton n'est présente qu'en Afrique du Sud (Cho *et al.* 2006) et la troisième espèce du genre, *Bifurcaria bifurcata*. R. Ross, est présente seulement le long des côtes atlantiques d'Europe et d'Afrique du Nord-Ouest (Guiry et Guiry 2009).

2.4.2. *Cystoseira*

Le genre *Cystoseira* présente 47 espèces reconnues. La majorité de ces espèces vit dans les eaux de la Mer Méditerranée, de l'Océan indien et de l'Océan Pacifique. Mais c'est en Mer Méditerranée que l'on retrouve la plus forte diversité spécifique. En effet, ce genre connaît sur le littoral méditerranéen une différenciation très importante avec plus d'une trentaine de taxons différents (Cabioc'h *et al.* 2006), soit plus de 60% du nombre d'espèces reconnues. À noter que le genre *Cystoseira* est présent dans le Nord-Ouest du Pacifique, des îles Aléoutiennes (Alaska) à l'état de Washington) avec une espèce endémique de cette région : *Cystoseira germinata* C. Agardh.

En Bretagne, cinq espèces de *Cystoseira* sont présentes : *C. baccata* (S.G. Gmelin) P.C. Silva, *C. foeniculacea* (Linnaeus) Greville, *C. humilis* Schousboe ex Kützinger, *C. nodicaulis* (Withering) M. Roberts et *C. tamariscifolia* (Hudson) Papenfuss. La taxonomie du genre est complexe. Afin de suivre ces différentes espèces et mieux comprendre leur écologie, ainsi que leurs relations phylogénétiques, une étude d' α -taxonomie, de taxonomie moléculaire et de chimiotaxonomie a démarré (Thèse de C. Jegou, en cours).

2.4.3. *Sargassum*

Avec 352 espèces, le genre *Sargassum* est présent dans la quasi totalité des océans, tempérés et tropicaux, du globe (Guiry et Guiry 2009). Néanmoins, on retrouve la plus forte diversité spécifique du genre *Sargassum* dans les régions intertropicales du Pacifique Ouest avec plus de 130 espèces recensées dont 60% seraient endémiques au Pacifique (Phillips 1995, Mattio 2008). Face à ce grand nombre d'espèces, les taxonomistes ont rapidement divisé le genre en 4 sous-genres qui sont *Bactrophyucus*, *Phyllotrichia*, *Sargassum* et *Schizophycus*. Ces sous-genres se différencient par la morphologie des frondes, des réceptacles

et des vésicules aérifères. Dans notre étude une espèce de *Bactrophycus*, *S. muticum* (Yendo) Fensholt et 3 espèces du sous-genre *Sargassum*, *S. cristaefolium* C. Agardh, *S. aquifolium* (Turner) C. Agardh et *S. polycystum* C. Agardh, ont été étudiées.

2.4.4. *Turbinaria*

Le genre *Turbinaria* est, quant à lui, un genre strictement inter et subtropical. Les espèces de ce genre ne vivent que dans les mers chaudes (Mer de Chine, Mer des Philippines, Pacifique Sud, Mer des Caraïbes, Mer Rouge, Océan Indien). Le genre est représenté par 22 espèces et la plus forte diversité est retrouvée en Asie du Sud Ouest (Inde, Sri Lanka) avec 14 espèces recensées (Guiry et Guiry 2009). En Atlantique, le genre *Turbinaria* n'est présent que dans les Caraïbes avec l'espèce *T. turbinata* (Linnaeus) Kuntze alors que dans le Pacifique Sud, trois espèces sont présentes : *T. conoides* (J. Agardh) Kützinger, *T. decurrens* Bory de Saint-Vincent et *T. ornata* (Turner) J. Agardh.

2.5. Description des espèces étudiées en Bretagne

2.5.1. Choix des espèces

En Bretagne, nous nous sommes intéressées à des espèces présentant de fortes biomasses et accessibles à pieds lors des basses mers de vives eaux. Notre choix s'est porté sur 3 espèces vivant en interaction au sein d'un même biotope (Figure 29) :

- *Sargassum muticum*, espèce introduite, seule représentante de son genre sur les côtes bretonnes et constituant d'importantes biomasses durant la période estivale.
- *Bifurcaria bifurcata*, espèce native, couramment observée sur le littoral breton et abondante toute l'année ;
- et enfin, *Cystoseira baccata*, espèce native et saisonnière, qui se distingue facilement des 4 autres espèces du genre *Cystoseira* décrites en Bretagne.

*Cystoseira baccata**Bifurcaria bifurcata**Sargassum muticum*

Figure 29 : Photographies des 3 espèces de Sargassaceae étudiées en Bretagne

2.5.2. *Sargassum muticum*

Sargassum muticum appartient au sous-genre *Bactrophycus*, très répandu dans le Pacifique Nord. Elle a été introduite sur les côtes européennes, via l'Angleterre, probablement suite à l'importation d'huîtres creuses du Japon, *Crassostrea gigas* Thunberg, dans les années 1960. Elle a été signalée pour la première fois à Bembridge, Isle of Wight, en 1971 (Farnham 1980). *S. muticum* s'est ensuite dispersée sur les côtes du Solent et de la Cornouaille anglaise jusqu'à Plymouth., Dans le même temps, l'espèce a traversé la Manche et gagné la Normandie, où elle a été signalée en 1975 à Vaaut La Hougue. Dès la fin des années 1970, la Sargasse japonaise est signalée en Bretagne : à Dinard (Côte d'Armor) en 1978, près de Roscoff (Finistère) et à Fort Bloqué (Morbihan) en 1981. En Méditerranée, l'espèce a d'abord été signalée, au début des années 1980, dans l'Etang de Thau (Critchley 1983), puis à Banyuls -sur-mer au milieu des années 1980 (Lorraine 1989) et à Venise en 1992 (Curiel *et al.* 1998).

En Europe, l'aire de répartition de *S. muticum* s'étend actuellement du Portugal à la Norvège du côté atlantique et de l'Espagne à l'Italie du côté méditerranéen (Mineur, communication personnelle). Néanmoins, la distribution de l'espèce n'est toujours pas stable et elle tend à s'élargir d'année en année (Figure 30).

Cette algue, fixée au substrat par un disque basal, est constituée d'un ou plusieurs axes principaux pérennes, de quelques centimètres de long d'où partent des rameaux primaires saisonniers pouvant atteindre plusieurs mètres de long (appelés latérales) (Figure 31). Ces latérales sont elles-mêmes pourvues de rameaux secondaires possédant des aérocytes, appelés également flotteurs ou vésicules aérifères.

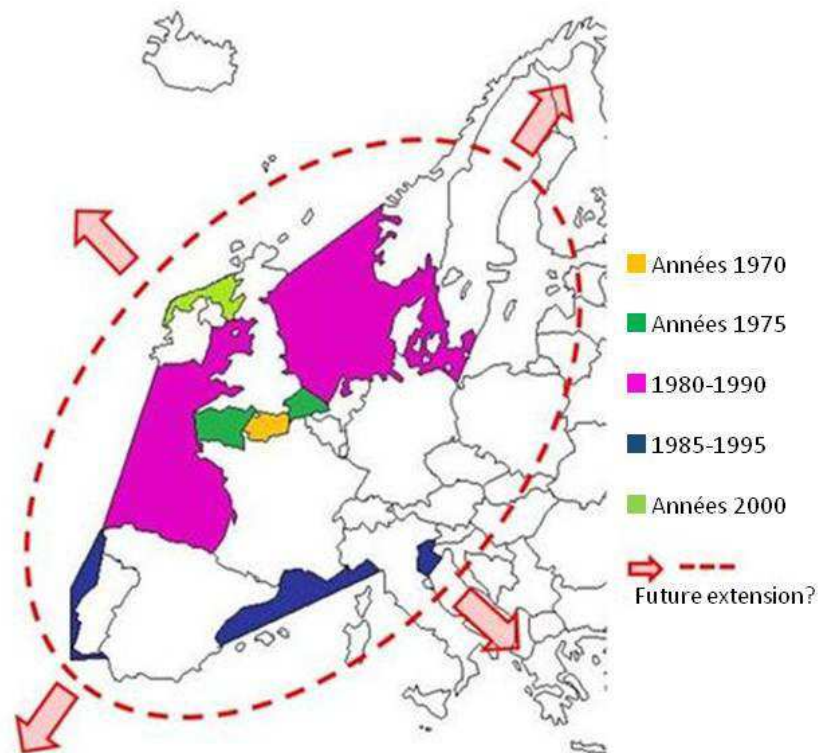


Figure 30 : Extension au cours du temps de la distribution de *Sargassum muticum* le long des côtes atlantiques et méditerranéennes d'Europe, de 1970 à nos jours (d'après Mineur F., données non publiées).

A maturité, à la fin du printemps en Bretagne, les organes reproducteurs apparaissent sur certaines latérales, sous la forme de vésicules cylindriques appelées réceptacles. *Sargassum muticum* est monoïque, les gamètes mâles et femelles sont situés sur le même réceptacle mais au sein de conceptacles différents (Fletcher et Fletcher 1975). Seuls les gamètes mâles sont émis dans l'eau de mer, les gamètes femelles restant fixés à l'aplomb des conceptacles, à la surface des réceptacles, jusqu'à ce que des gamètes mâles viennent les féconder. La fécondation a lieu en surface de réceptacle et l'embryon y reste fixé et se développe sur l'individu parent jusqu'à un stade pluricellulaire. C'est une jeune plantule qui sera ensuite libérée dans l'eau de mer et qui se fixera sur un substrat dur (roche, débris...).

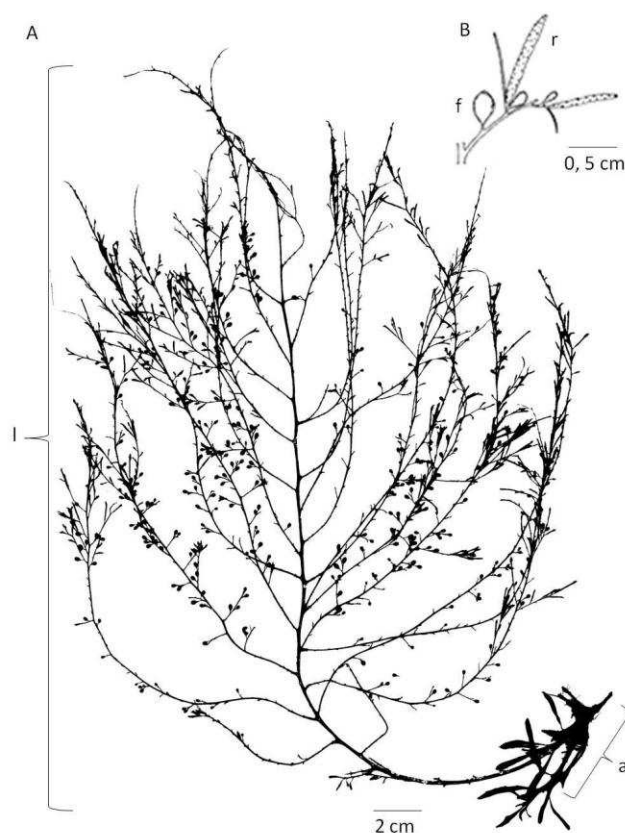


Figure 31 : Morphologie générale d'un thalle de *Sargassum muticum*. A : thalle immature constitué d'un axe principal court (a) et d'une latérale présentant des flotteurs (l) (d'après Coppejans 1995) B : fragment de latérale présentant des réceptacles (r) et des flotteurs (f).

Cette algue tolère les milieux à faible et fort hydrodynamisme, elle est néanmoins plus abondante en mode abrité. Elle connaît une large distribution bathymétrique, de l'étage médiolittoral jusque dans l'infralittoral. La plupart du temps, elle se développe dans des cuvettes du médiolittoral et elle peut représenter de fortes biomasses pendant la période estivale.

Sargassum muticum est suivie au laboratoire depuis 7 ans. Elle a déjà fait l'objet de travaux de thèse sur l'utilisation de la biomasse comme source de composés à activité antifouling (Plouguerné 2006). Ainsi, diverses molécules, responsables de la défense antifouling, ont pu être isolées (Plouguerné *et al.* 2008, 2009).

2.5.3. *Cystoseira baccata*

Cystoseira baccata (S.G. Gmelin) P.C. Silva est une espèce indigène des côtes bretonnes, décrite dans le passé sous le nom de *Cystoseira fibrosa* et très commune sur les côtes françaises (Wuitner 1946).

Son aire de répartition s'étend de la Mauritanie aux Pays Bas en passant par les îles Canaries et l'Irlande. C'est une espèce stricte des côtes atlantiques, présente dans l'étage infralittoral et pouvant remonter dans des cuvettes profondes du bas du médiolittoral.

Cette algue possède un thalle de grande taille, jusqu'à 1 m de long, fixé au substrat par un disque basal encroutant et remarquable par son axe principal aplati à ramification distique et alterne, et la présence, dans la région basale, de rameaux aplatis et lisses très caractéristiques. Les flotteurs sont souvent de grandes tailles et bien visibles mais ce caractère est variable selon la localisation géographique (Figure 32).

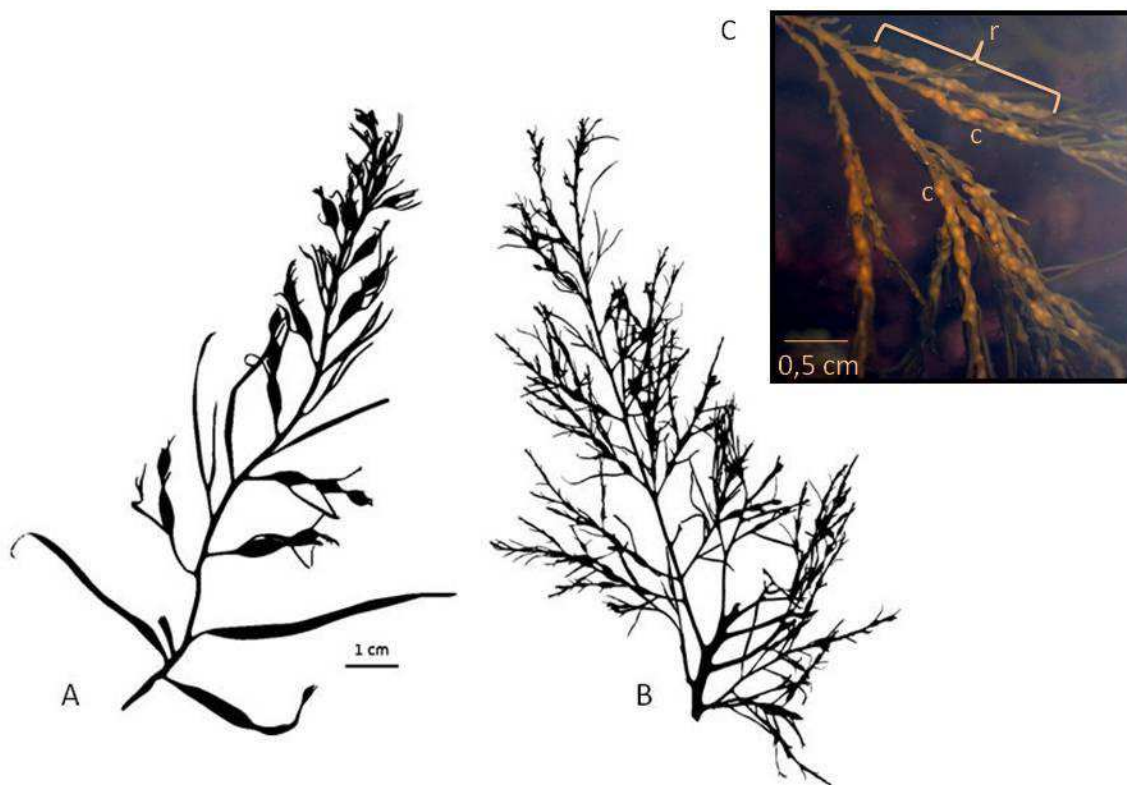


Figure 32 : Morphologie d'un thalle de *Cystoseira baccata*. A : à Penmarch (d'après Jegou, comm. pers.), B : à la Pointe du Diable, C : Détail de l'apex d'un rameau de *C. baccata* présentant des réceptacles matures (r). Les points plus clairs sont les conceptacles hermaphrodites remplis de gamètes (c).

Cette espèce devient mature durant la période hivernale. Elle est monoïque, les gamètes mâles et femelles sont situés sur le même réceptacle et au sein d'un même conceptacle (Observations personnelles). Les réceptacles se forment à l'apex de certaines latérales (Figure 32C).

Cette espèce a été étudiée pour ses capacités de bioabsorption des métaux lourds (Herrero *et al.* 2005, Lodeiro *et al.* 2006). Elle a également fait l'objet d'études concernant les structures des communautés de macroalgues benthiques en Espagne (Diez *et al.* 1999, Diez *et al.* 2003) ainsi que dans un travail concernant l'épiphytisme de macroalgues (Arrontes 1990). Récemment, une étude a été menée sur les composés terpéniques de cette algue. Certains des meroditerpénoides et dérivés isolés ont montré des activités antifouling intéressantes puisque ces composés n'ont pas présenté de toxicité envers les larves d'oursins et d'huîtres (Mokrini *et al.* 2008). Néanmoins, **à notre connaissance, aucune étude récente concernant la biologie des populations de *Cystoseira baccata* n'a été publiée.**

2.5.4. *Bifurcaria bifurcata*

Bifurcaria bifurcata. R. Ross est une espèce indigène des côtes bretonnes, décrite pour la première fois sous le nom de *Bifurcaria tuberculata* Stackhouse. En 1946, cette espèce est considérée comme commune sur le littoral français (Wuitner 1946).

Cette espèce forme une ceinture caractéristique du bas de l'étage médiolittoral, en mélange avec *Himanthalia elongata* (Linnaeus) S.F. Gray mais elle est également présente dans les mares du médiolittoral.

Son aire de répartition s'étend du Maroc aux pays Bas en passant par l'Irlande. C'est une espèce stricte des côtes atlantiques.

Le thalle de cette espèce naît d'un faux rhizome rampant ramifié, d'où partent des axes cylindriques et dichotomes, légèrement étranglés aux articulations, de 3 à 4 mm de diamètre et de teinte brun clair. L'apex des rameaux est souvent renflé et verruqueux. Ces renflements sont les réceptacles contenant les conceptacles (Figure 33). Du fait de la présence du faux rhizome, il est délicat de dénombrer précisément le nombre de pied. **Chez *B. bifurcata*, la notion d'individu est donc difficilement appréciable.**

La période de reproduction de *B. bifurcata* se situe durant la période hivernale, les réceptacles se forment à l'extrémité des rameaux durant l'automne. L'espèce est monoïque, et présente des conceptacles hermaphrodites (Observations personnelles).

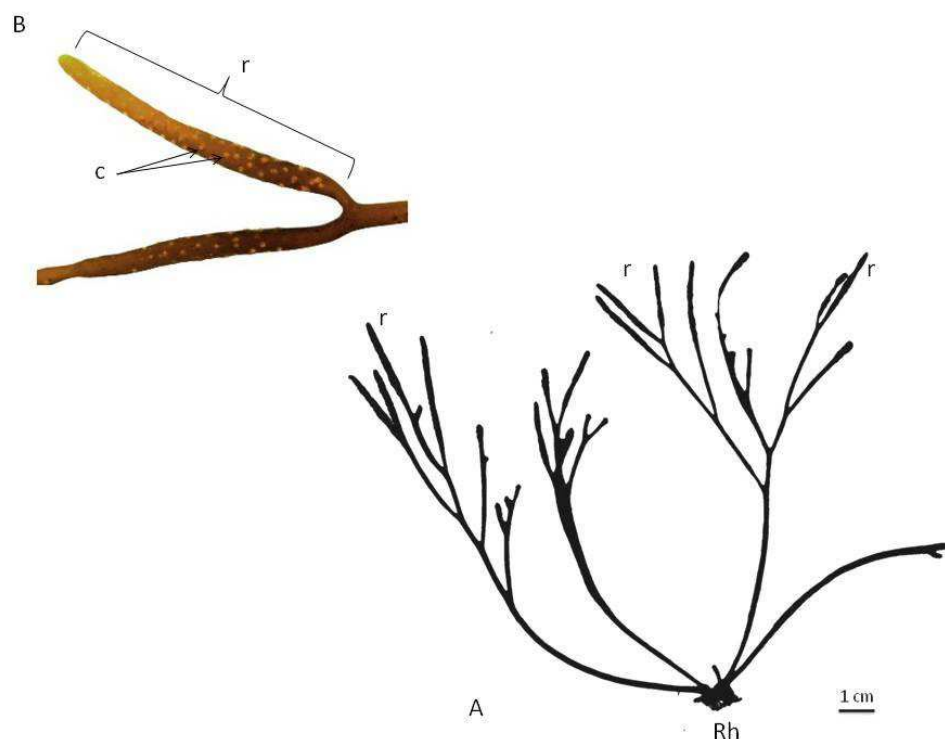


Figure 33 : Morphologie générale d'un thalle de *Bifurcaria bifurcata*. A : Thalle présentant un faux rhizome (Rh) et des latérales portant en apex des réceptacles (r), B : Détail de l'apex d'une latérale de *B. bifurcata* présentant des réceptacles matures (r). Les points plus clairs sont les conceptacles hermaphrodites (c) remplis de gamètes.

Les études concernant *B. bifurcata* ont surtout portées sur ses composés terpéniques (Biard *et al.* 1980, Valls *et al.* 1986, Semmak *et al.* 1988, Hougaard *et al.* 1991, Valls *et al.* 1995, Culioli *et al.* 1999a, Culioli *et al.* 1999b, Culioli *et al.* 2000, Culioli *et al.* 2001, Daoudi *et al.* 2001, Culioli *et al.* 2002, Culioli *et al.* 2004, Ortalo-Magné *et al.* 2005, El Hattab *et al.* 2008). Certaines de ces études ont permis de mettre en évidence l'existence de plusieurs types ou variétés chimiques au sein de cette espèce (e.g. : Valls *et al.* 1995, Daoudi *et al.* 2001). *B. bifurcata* a été étudiée comme source de composés à activité antifouling (Hellio *et al.* 2001, Maréchal *et al.* 2004), à activité antioxydante (Connan *et al.* 2007, Le Lann *et al.* 2008a, Zubia *et al.* 2009) et antitumorale (Moreau *et al.* 2006b, Zubia *et al.* 2009). Cette espèce a été prise en compte dans des études concernant les structures des communautés de macroalgues benthiques (Connan 2004, Rindi et Guiry 2004, Sanchez *et al.* 2005, Sanchez et Fernandez 2006). Néanmoins, **à notre connaissance, aucune étude récente concernant la biologie des populations de *Bifurcaria bifurcata* n'a été publiée.**

2.6. Description des espèces étudiées dans le Pacifique Sud

2.6.1. Choix des espèces

Dans le Pacifique Sud, nous nous sommes intéressées à des espèces des deux genres *Sargassum* et *Turbinaria* représentant de fortes biomasses et structurant leurs habitats (Rossier et Kulbicki 2000). Dans chaque zone géographique, pour respecter les objectifs du projet CRISP/AFD, les espèces les plus abondantes ont été récoltées ce qui a eu pour conséquence une non homogénéité dans la répartition des espèces étudiées. De par le gradient de biodiversité qui existe dans le Pacifique Sud (encadré I-2), seule *Turbinaria ornata* est présente dans les trois zones géographiques, *Sargassum aquifolium* l'est dans deux zones. Quant aux autres espèces, elles apparaissent ponctuellement dans l'une des trois zones (Figure 34).

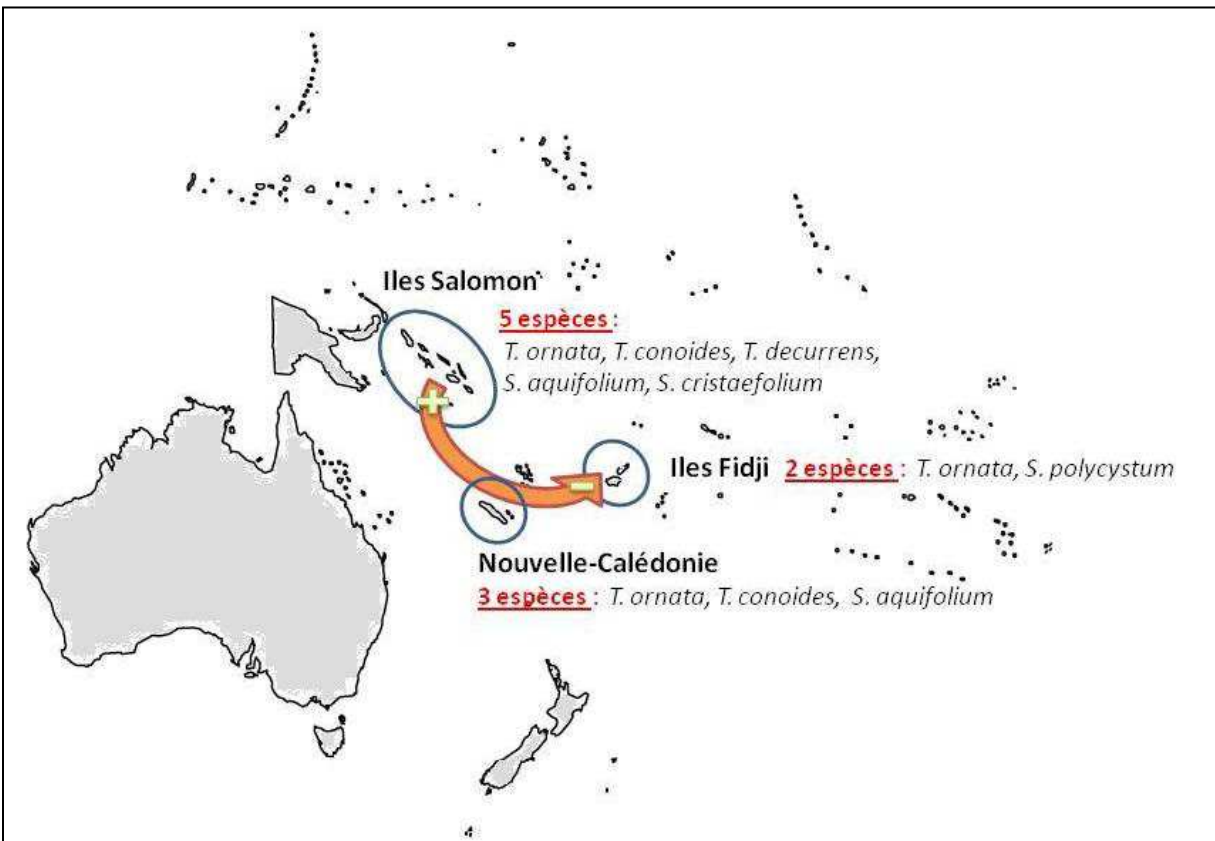


Figure 34 : Positionnement des espèces de *Sargassum* (S.) et *Turbinaria* (T.) étudiées dans le Pacifique Sud, en fonction des zones géographiques et du gradient de biodiversité (flèche orange)

2.6.2. Espèces du genre *Sargassum*

Au cours de la campagne de récolte, trois espèces du genre *Sargassum* et appartenant au sous-genre *Sargassum* ont été récoltées : *Sargassum polycystum* C. Agardh, *Sargassum cristaefolium* C. Agardh et *Sargassum aquifolium* J. Agardh (Figure 35).

L'appareil végétatif de ces trois espèces se compose d'un disque basal fixé au substrat, d'un ou plusieurs axes principaux et de ramifications secondaires qui portent des appendices foliacés (pseudofeuilles), des vésicules aérifères et des organes reproducteurs (réceptacles). La forme des pseudofeuilles, des vésicules et des réceptacles est très diversifiée. De plus ces caractères morphologiques peuvent présenter une forte plasticité en fonction des saisons et des facteurs de l'environnement, ce qui rend la taxonomie de ce genre très complexe (Mattoo 2008).

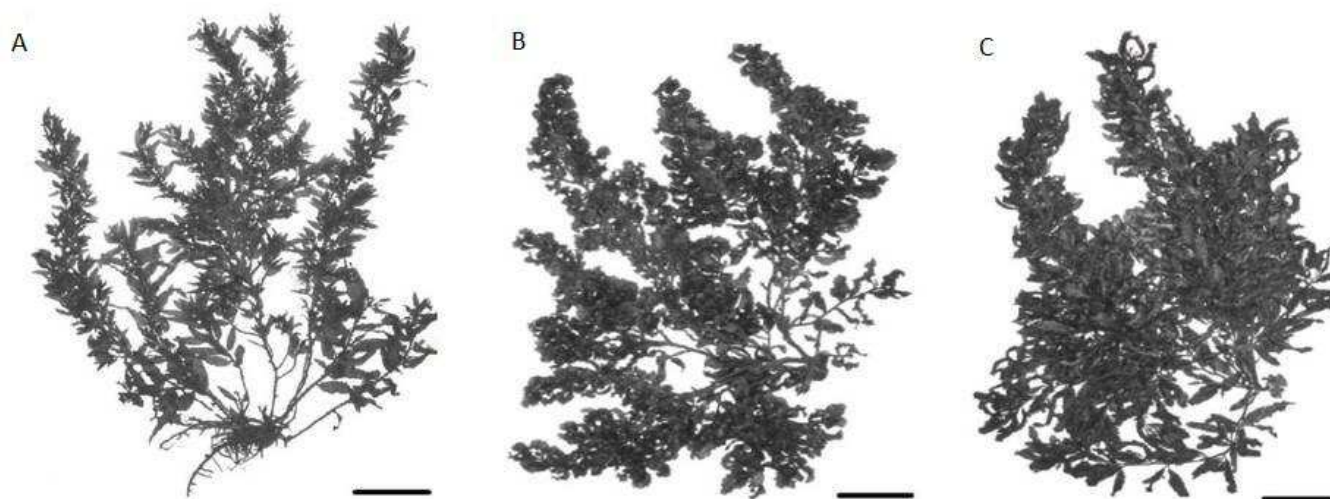


Figure 35 : Morphologie générale de *Sargassum polycystum* C. Agardh, d'après l'herbier IRD1572 (morphotype SB). (A), de *Sargassum cristaefolium* C. Agardh, d'après l'herbier IRD1564 (morphotype CSA) (B) et de *Sargassum aquifolium* J. Agardh, d'après l'herbier IRD1558 (morphotype DLM) (C). Échelle 3 cm (d'après Mattio 2008).

2.6.3. Espèces du genre *Turbinaria*

Nous avons obtenu trois espèces du genre *Turbinaria* provenant des îles du Pacifique Sud : *T. ornata* (Turner) J. Agardh, *T. conoides* (J. Agardh) Kützinger et *T. decurrens* Bory de Saint-Vincent.

L'appareil végétatif de ces trois espèces est caractérisé par une structure cladomienne, axe à croissance apicale illimitée portant des ramifications latérales à croissance limitée appelées pleuridies, décrite chez les thallophytes les plus évoluées. Les espèces du genre *Turbinaria* présentent un axe principal

orthotrope (dressé), coriace, de couleur marron à marron clair et d'une taille maximale d'environ 30 cm. Cet axe porte des pleuridies de forme conique ou pyramidale, dont la disposition générale donne à l'algue un volume cylindrique. Le thalle est solidement fixé au substrat par un disque basal conique et un système de stolons nommés haptères. Sur ces stolons peuvent apparaître de nouveaux thalles par multiplication végétative (repousse). Les pleuridies des espèces du genre *Turbinaria* sont plus ou moins dentées sur les bords et possèdent une vésicule centrale remplie de gaz ce qui permet à l'algue de se maintenir en position verticale au-dessus de son point de fixation ou de flotter au gré des courants lorsqu'elle se détache du récif. A la base de certaines pleuridies, à maturité, apparaissent les réceptacles où sont produits les gamètes. Les espèces du genre *Turbinaria* se reproduisent soit par voie sexuée, soit par multiplication végétative via les repousses au niveau de stolons. Il n'est pas possible de noter une différence morphologique entre les individus issus de la reproduction sexuée et ceux issus de la multiplication végétative.

La différenciation des espèces s'effectue par la morphologie des pleuridies (forme et disposition des dents). Une description des espèces figurant dans cette étude est présentée à la Figure 36.

Ainsi, *Turbinaria conoides* présente deux types de morphologies. Un premier type (noté A sur la Figure 36) est constitué de pleuridies relativement petites et turbinées (coniques) avec une marge distale bien marquée, des dents marginales distales assez larges et des crêtes longitudinales latérales édentées. Les pleuridies de ce type morphologique ne présentent pas de dents intramarginales, leurs vésicules sont plutôt proéminentes et leurs réceptacles sont progressivement racémisés (en forme de grappe) sur un axe apparent (Taylor 1964). Le deuxième type (noté B dans la Figure 36) est caractérisé par des pleuridies larges, des marges distales bien marquées, profondément dentées et parfois rétroflexes, des dents intramarginales qui peuvent être soit placées de manière irrégulière, soit formant une couronne partielle et de nombreux cryptostomates proéminents, ainsi qu'une vésicule de section tétraédrique relativement petite (Rohfrisch 2006).

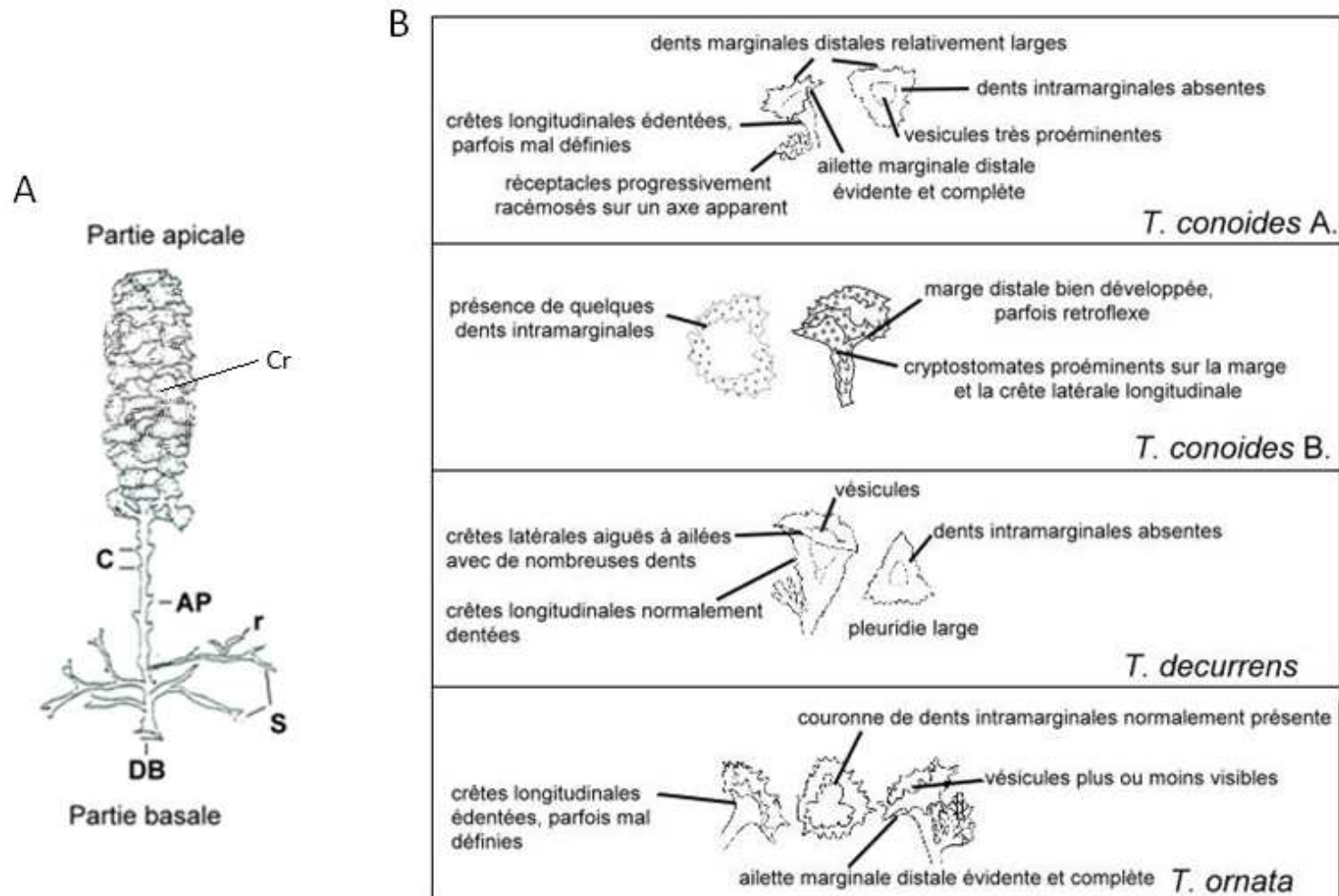


Figure 36 : Description morphologique des espèces de *Turbinaria conoides*, *T. decurrens* et *T. ornata* (d'après Taylor 1964, Stiger 1997 et Rohfritsch 2006). A : aspect général du thalle d'après *T. ornata* (AP : axe principal , C : cicatrice , Cr : cryptostomate¹, DB : disque basal , , r : repousse , S : stolons) et B : Description morphologique des pleuridies des espèces présentes dans cette étude

¹ Cryptostomate : cavité enfouie dans le thalle, ouverte vers la surface et uniquement tapissée de poils

Turbinaria decurrens présente des pleuridies larges (souvent plus de 10 mm) avec des crêtes longitudinales latérales dentées, des crêtes latérales aiguës à ailées avec de nombreuses dents et des dents intramarginales distales absentes. Leurs vésicules sont assez petites et insérées profondément dans les pleuridies (Taylor 1964).

Enfin, *Turbinaria ornata* est reconnaissable par la présence de dents intramarginales pouvant être réduites à une ou deux dents, combinée à une marge étroite, épaisse et dentée (Rohfritsch *et al.* 2007).

Il est difficile de différencier les espèces *T. conoides* et *T. ornata* par une simple analyse morphologique. Ainsi, la distinction morphologique de certaines espèces, voire de variétés, est complexe. Pour cela, une étude chimiotaxonomique a été menée afin de mettre en évidence des types chimiques particuliers au sein de la famille des Sargassaceae. Cette étude est développée dans le Chapitre III, §1 - Distinction interspécifique par isolement de chimiomarqueurs au sein du genre *Turbinaria* p. 180).

Avant tout, nous nous sommes intéressées à la variabilité spatiale et/ou temporelle des espèces étudiées en suivant certaines variables d'état, de reproduction et/ou de défense. Ceci fait l'objet du Chapitre II suivant.

CHAPITRE II : ECOLOGIE CHIMIQUE DES SARGASSACEAE

Introduction

L'**écologie chimique** peut être décrite comme l'étude des interactions à médiation chimique qui existent entre les organismes et/ou entre les organismes et leur environnement chimique. Ces interactions peuvent être classées en 3 catégories : la communication chimique entre les organismes, la détection et la réponse adaptée des organismes aux variations de leur environnement et enfin, **la défense chimique**, c'est-à-dire la synthèse par les organismes de composés chimiques pour faire face à des prédateurs, des brouteurs, des pathogènes et autres compétiteurs (Amsler et Fairhead 2006).

Généralement les molécules impliquées dans l'écologie chimique et plus particulièrement dans la défense chimique appartiennent au métabolisme secondaire. On les appelle soit métabolites secondaires, soit substances naturelles (*natural products* en anglais). Cela permet de les distinguer des composés ayant un rôle dans le métabolisme primaire au sein des cellules de nombreux taxons (Amsler et Fairhead 2006). Cependant, certains métabolites, tels les composés phénoliques ou la fucoxanthine, sont des exceptions car ils sont susceptibles d'intervenir aussi bien au niveau primaire que secondaire.

Les **composés phénoliques** ou **phlorotannins** sont des polymères de phloroglucinol (1,3,5-trihydroxybenzene) et sont classés en 6 groupes en fonction de leur structure chimique. On distingue ainsi les Fucols, Phloréthols, Fucophloréthols, Fuhalols, Isofuhalols et Eckols (Figure 37) (Ragan et Glombitza 1986). Le poids moléculaire des composés phénoliques varie entre 126 Da et 650 000 Da chez les Phaeophyceae (Targett et Arnold 2001) mais les plus couramment rencontrés ont une taille comprise entre 10 000 et 100 000 Da (Boettcher et Targett 1993).

Chez les Phaeophyceae, les composés phénoliques sont localisés principalement dans des organites appelés physodes, eux-même localisés dans le cytoplasme des cellules algales (Ragan et Glombitza 1986, Schoenwaelder 2002). Les phlorotannins sont aussi retrouvés au sein des parois cellulaires (Schoenwaelder et Clayton 1999a) où ils sont incorporés après libération des physodes. En effet, les physodes sont en interaction avec le cytosquelette des cellules, ce qui leur permet de se mouvoir vers les zones de construction de la paroi cellulaire (Schoenwaelder et Clayton 1999b). Concernant la voie de biosynthèse de ces composés, 2 hypothèses sont proposées dans la littérature : les phlorotannins seraient synthétisés soit via la voie de l'acétate-malonate (Arnold et Targett 2002) ou soit via la voie de l'acide shimique, comme pour les tannins des plantes vasculaires (Chen *et al.* 1997).

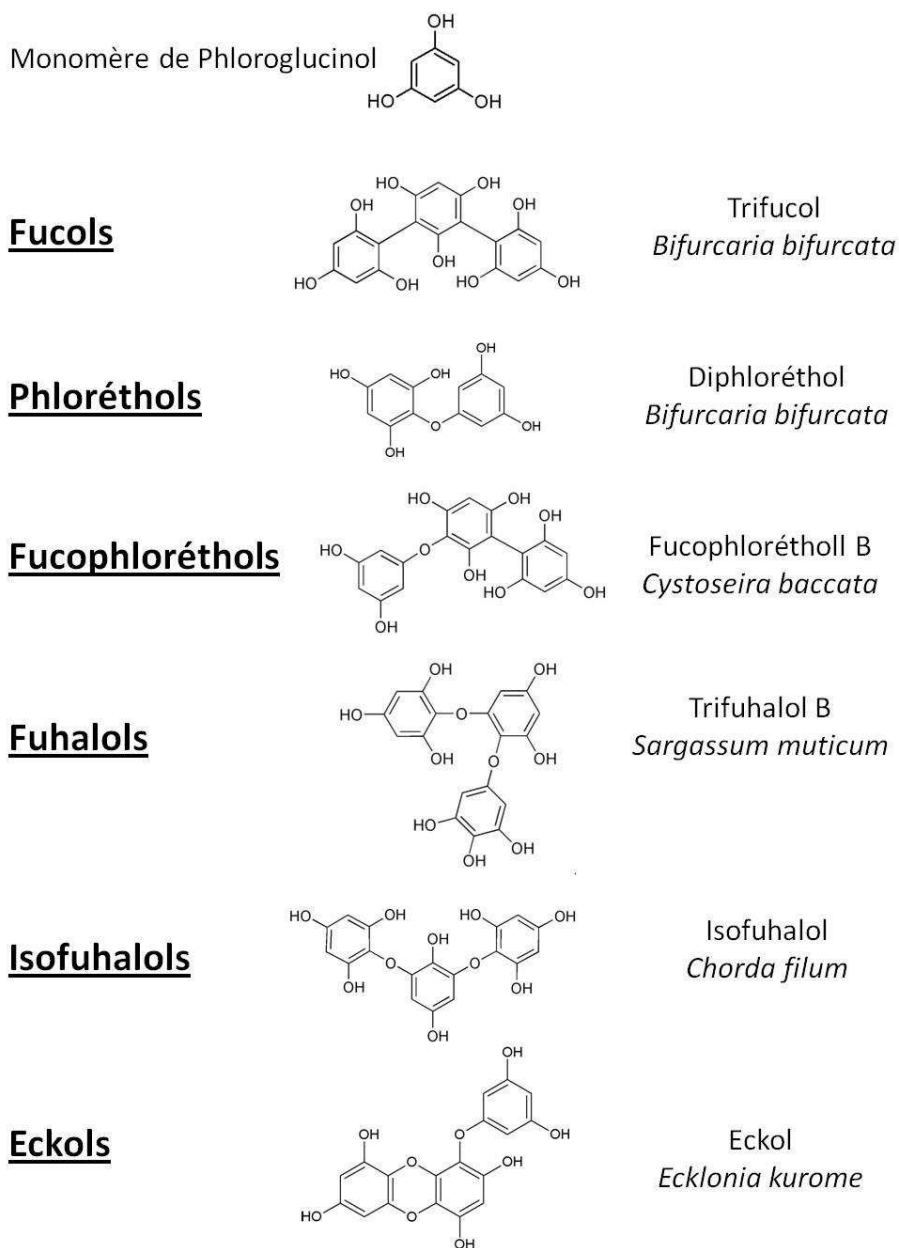


Figure 37: Structures chimiques illustrant les 6 classes de Phlorotannins retrouvés chez les Phaeophyceae avec mention de l'espèce où a été isolé le composé. Les Phlorotannins sont classés en fonction de la structure du polymère de phloroglucinol (d'après Ragan et Glombitza 1986, Amsler et Fairhead 2006, Kornprobst 2006, Singh et Bharate 2006).

Dans leur revue, Amsler et Fairhead (2006) recensent 4 rôles cellulaires et 7 rôles écologiques potentiels attribués aux composés phénoliques des Phaeophyceae. Les rôles cellulaires des phlorotannins sont les suivants :

- la structuration de la paroi via la complexification des composés phénoliques avec les alginates (Schoenwaelder et Clayton 1999a).

- l'adhésion au substrat des zygotes. Une sécrétion de composés phénoliques coïnciderait avec l'adhésion des zygotes chez les Fucales (Schoenwaelder 2002, Potin et Leblanc 2006).
- l'inhibition des spermatozoïdes via la sécrétion de composés phénoliques juste après la fécondation de l'oosphère afin de limiter la polyspermie et donc de protéger le nouveau zygote.
- la guérison des blessures via une sécrétion de phlorotannins au niveau des tissus lésés. Ceci est l'un des plus vieux rôles connu des composés phénoliques chez les algues brunes (Amsler et Fairhead 2006) et récemment clarifié par Lüder et Clayton (2004).

Les rôles écologiques attribués aux composés phénoliques sont, pour la plupart, très bien détaillés dans la littérature. Le Tableau 5 recense la diversité des rôles écologiques des phlorotannins.

Tableau 5 : Etude bibliographique des rôles écologiques présumés des composés phénoliques chez les Phaeophyceae (d'après Amsler et Fairhead 2006).

Rôles Ecologiques présumés des composés phénoliques chez les Phaeophyceae	études correspondantes
Défense contre les herbivores : un rôle ambigu	Geiselman et McConnell 1981, Steinberg 1984, Steinberg 1985, Johnson et Mann 1986, Steinberg 1986, Steinberg 1988, Van Alstyne 1988, Ireland et Horn 1991, Steinberg <i>et al.</i> 1991, Steinberg et van Altena 1992, Winter et Estes 1992, Yates et Peckol 1993, Poore 1994, Cronin et Hay 1996a, Pavia <i>et al.</i> 1997, Targett et Arnold 1998, Wakefield et Murray 1998, Pereira et Yoneshigue-Valentin 1999, Van Alstyne <i>et al.</i> 1999a, Pavia et Toth 2000a, Toth et Pavia 2001a, Van Alstyne <i>et al.</i> 2001, Pavia <i>et al.</i> 2002, Deal <i>et al.</i> 2003, Jormalainen <i>et al.</i> 2003, Hemmi <i>et al.</i> 2004, Jormalainen et Honkanen 2004, Kubanek <i>et al.</i> 2004
Effet sur la digestion et la reproduction	Tugwell et Branch 1989, Ireland et Horn 1991, Steinberg et van Altena 1992, Winter et Estes 1992, Boettcher et Targett 1993, Targett <i>et al.</i> 1995, Stern <i>et al.</i> 1996, Pavia <i>et al.</i> 1997, Cruz-Rivera et Hay 2001, Targett et Arnold 2001, Honkanen <i>et al.</i> 2002, Hemmi et Jormalainen 2004, Jormalainen et Honkanen 2004, Kubanek <i>et al.</i> 2004, Toth <i>et al.</i> 2005
Activités antibactérienne et antifouling	Sieburth et Conover 1965, Langlois 1975, Ragan et Glombitza 1986, Jennings et Steinberg 1994, Jennings et Steinberg 1997, Lau et Qian 1997, Lau et Qian 2000, Lüder et Clayton 2004, Wikström et Pavia 2004, Honkanen et Jormalainen 2005
Photoprotection	Pavia <i>et al.</i> 1997, Pavia et Brock 2000, Schoenwaelder 2002, Swanson et Druehl 2002, Henry et Van Alstyne 2004, Fairhead <i>et al.</i> 2006
Chélation des métaux lourds	Ragan <i>et al.</i> 1979, Ragan et Glombitza 1986, Karez et Pereira 1995, Toth et Pavia 2000

Dans ce travail de thèse, concernant l'étude du pool de composés phénoliques, une double approche a été menée. Les teneurs en phlorotannins (**approche quantitative**) et la composition ou la nature du pool de ces composés (**approche qualitative**) en fonction des classes de taille (inférieur à 2 000 Da, entre 2 000 et 5 000 Da, entre 5 000 et 12-14 000 Da et supérieur à 12-14 000 Da) ont servi d'exemple pour étudier la diversité de la réponse chimique des Sargassaceae à leur environnement. Cette étude qui a été menée à la fois sur les côtes bretonnes et dans le Pacifique Sud devraient nous permettre d'accéder à la nature du pool de composés synthétisés à grandes échelles en comparant les deux milieux, tempéré et tropical.

Les teneurs en composés phénoliques varient en fonction de très nombreux facteurs. En effet, comme l'illustre le Tableau 6, il existe des variations intra-individuelles, intraspécifiques, interspécifiques, en fonction de l'âge des tissus, du stade de développement, du stade reproducteur, en fonction des saisons et/ou du niveau bathymétrique ou encore des variations géographiques à plus ou moins grandes échelles (cf. Tableau 6 pour les références bibliographiques).

Tableau 6 : Sources de variations des teneurs en composés phénoliques retrouvées dans la littérature.

Sources de variation	Etudes correspondantes
Intra-individuelles (en fonction de la partie du thalle considérée)	Tugwell et Branch 1989, Pavia <i>et al.</i> 2003, Connan 2004, Fairhead <i>et al.</i> 2005
Intra-spécifiques (intra-populationnelles)	Pavia <i>et al.</i> 2003 , Fairhead <i>et al.</i> 2005
Interspécifiques	Connan 2004, Fairhead <i>et al.</i> 2005 , Stiger <i>et al.</i> 2004, Le Lann <i>et al.</i> 2008a
En fonction de l'âge des tissus	Pavia <i>et al.</i> 2003
En fonction du stade de développement	Stiger <i>et al.</i> 2004
En fonction de la maturité des thalles adultes	Plouguerné <i>et al.</i> 2006
Intra-spécifiques (inter-populationnelles) : au niveau d'une petite échelle géographique	Steinberg 1989, Targett <i>et al.</i> 1992, Pavia et Åberg 1996, Toth et Pavia 2000, Pavia <i>et al.</i> 2003, Connan 2004, Stiger <i>et al.</i> 2004, Plouguerné <i>et al.</i> 2006
En fonction du niveau bathymétrique (petite échelle géographique)	Connan 2004, Fairhead <i>et al.</i> 2005
Intra-spécifiques : au niveau d'une grande échelle géographique	Steinberg 1989, Van alstyne et Paul 1990, Targett <i>et al.</i> 1992, Van Alstyne <i>et al.</i> 1999b
En fonction des saisons	Connan 2004, Stiger <i>et al.</i> 2004, Plouguerné <i>et al.</i> 2006

Ensuite, nous nous sommes intéressées à un pigment photoprotecteur, **la fucoxanthine**. C'est une xanthophylle (Figure 38) qui appartient au cortège pigmentaire des Hétérokontes et des Phaeophyceae en particulier. Ce pigment appartient aux caroténoïdes et est de couleur brun-orangé, ce qui donne leur couleur particulière aux algues brunes. Les pigments caroténoïdes exercent une double fonction. D'une part, ils absorbent certaines longueurs d'onde non absorbée par la chlorophylle *a*, élargissant ainsi le spectre des couleurs pouvant alimenter la photosynthèse. Lorsqu'un photon frappe un caroténoïde, l'énergie est transférée à la chlorophylle *a* qui se comporte alors comme si elle avait elle-même absorbé le photon (Campbell 1995). Et d'autre part, ils protègent la chlorophylle contre une destruction due à un excès de lumière (Hopkins 2003).

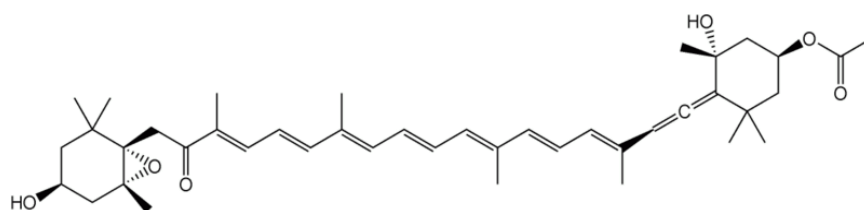


Figure 38 : Structure chimique de la fucoxanthine.

La fucoxanthine est une des composantes importantes de l'antenne collectrice des Phaeophyceae. Elle appartient aux complexes pigments-protéines assurant la collecte de l'énergie chez les algues brunes (De Martino 2000, Caron *et al.* 2001, De Reviers 2003a). Il s'agit de complexe intra-membranaires, composés de plusieurs polypeptides semblables fixant chacun 6 chlorophylles *a*, 2 chlorophylles *c* et 7 fucoxanthines (De Martino 2000). Le rôle primaire de la fucoxanthine est donc bien établi ici.

Chez les plantes vasculaires, les xanthophylles sont connues pour être des composés protégeant les chloroplastes contre les excès de lumière (Hopkins 2003). Chez les Phaeophyceae, la présence de violaxanthine, xanthophylle ne jouant pas de rôle dans la collecte d'énergie lumineuse, incite à penser que les xanthophylles jouent un rôle contre la photo-oxydation des centres réactionnels en captant l'oxygène. Ce phénomène réversible est connu sous le nom de cycle des xanthophylles chez les plantes vasculaires comme chez les Phaeophyceae (Gévaert *et al.* 2003). Ce cycle des xanthophylles est en relation avec le stress lumineux comme montré par Uhrmacher *et al.* (1995) et Schofield *et al.* (1998). De plus, Gévaert *et al.* (2003) ont montré chez *Laminaria saccharina*, via des expérimentations *in situ*, que la violaxanthine est progressivement réduite en zéaxanthine durant la marée descendante. Cette réduction permet alors d'éliminer l'excès d'énergie non utilisé par les chaînes de transfert d'électrons et évite qu'il soit utilisé pour produire de l'oxygène à l'état singulet, ce qui générerait à terme des radicaux libres. Durant la

marée montante, la zéaxanthine est de nouveau oxydée en violaxanthine, ce qui en reconstitue le stock (Gévaert *et al.* 2003, De Reviers 2003a). Ces auteurs (Gévaert *et al.* 2003) ont montré d'autre part que les teneurs en fucoxanthine, en β -carotène, en chlorophylle *a* et en chlorophylle *c* ne varient pas significativement au cours du cycle des marées. Ainsi, le rôle photoprotecteur des xanthophylles est bien établi chez les algues brunes. Néanmoins, celui de la fucoxanthine en particulier n'est, pour l'instant, que supposé. En effet, à notre connaissance, si le rôle antioxydant de la fucoxanthine est bien connu (Nomura *et al.* 1997, Yan *et al.* 1999, Sachindra *et al.* 2007), de même que son action protectrice contre les rayonnements UV (Heo et Jeon 2009), **le rôle physiologique de photoprotection de la fucoxanthine reste à prouver.**

De plus, si la fucoxanthine est connue pour ses nombreuses activités pharmaceutiques comme par exemple son activité antioxydante (Yan *et al.* 1999), anti-obésité (Maeda *et al.* 2007, Jeon *et al.* 2008) et anti-diabétique (Maeda *et al.* 2007), ses teneurs au sein des macroalgues brunes sont peu connues. En effet, d'après la littérature, un seul travail met en évidence les teneurs en fucoxanthine de différentes Phaeophyceae (Mori *et al.* 2004). De même, aucune investigation, à notre connaissance, n'a été menée pour étudier les possibles variations inter et/ou intra spécifiques de ce composé. **Ainsi, la fucoxanthine est un bon exemple pour illustrer la diversité écologique des Sargassaceae car c'est un composé que l'on retrouve sans variations majeurs de structure chez toutes les espèces de Phaeophyceae.**

Dans les deux milieux étudiés (Pointe Bretagne et Pacifique Sud), nous avons suivi les variations saisonnières et/ou spatiales des teneurs en molécules de défense.

En complément des études d'écologie chimique, et seulement en milieu tempéré, nous avons mené une étude sur la biologie des populations des Sargassaceae, via un suivi saisonnier et spatial de différentes variables d'état et de la reproduction. En milieu tropical, un tel suivi saisonnier n'a pas pu être mis en place pour des raisons d'accessibilité des sites dans le temps.

Ainsi ce Chapitre se structure de la manière suivante.

Une pré-étude a été menée afin de sélectionner le mode de conditionnement des algues à utiliser pour ne pas dégrader les composés phénoliques et ainsi rendre possible les comparaisons entre les deux milieux, tempéré et tropical.

Ensuite, nous avons mené des études afin de :

- comprendre les variations spatio-temporelles des Sargassaceae tempérées et ainsi de comparer deux espèces natives avec une espèce introduite.

- de doser des molécules de défense (composés phénoliques et fucoxanthine) et d'évaluer les activités antiradicalaire et antioxydante des composés phénoliques chez les Sargassaceae tempérées et tropicales, nous permettant ainsi de comparer ces métabolites en milieux tempéré et tropical.
- d'analyser la composition du pool de composés phénoliques chez les Sargassaceae tempérées et tropicales en fonction de différentes classes de taille et de confronter les résultats obtenus pour comparer les deux milieux étudiés.

Ces études d'écologie chimique ont été réalisables suite à l'assurance de l'identité spécifique des taxons étudiés, en particulier en milieu tropical où des erreurs taxonomiques sont possibles. Les résultats de ces études chimiotaxonomiques sont présentés au Chapitre III.

1. Matériel et méthodes

1.1.Optimisation du conditionnement en vue du démarrage de l'étude des composés phénoliques et des activités antioxydantes associées

Les algues tropicales ont été réceptionnées lyophilisées en Métropole. Nous avons donc mené une étude afin de vérifier si ce mode de conservation ne dégradait pas les composés phénoliques, ainsi que les activités antioxydantes et antiradicalaires associées. Pour cela, nous avons dosé les teneurs en composés phénoliques totaux et les activités antioxydantes associées sur du matériel frais, congelé, lyophilisé, étuvé à 60°C et séché à l'air libre sous serre (une serre a été utilisée pour s'affranchir de la météorologie et du climat). Cette étude comparative a été mise en place sur deux espèces d'algues tempérées : *Sargassum muticum*, algue à thalle souple et flexible et *Bifurcaria bifurcata* présentant un thalle cylindrique plus coriace. La Figure 39 ci-dessous illustre le protocole suivi.

Les protocoles utilisés afin d'effectuer les extractions et les dosages (teneur en composés phénoliques, activité antiradicalaire et antioxydante) sont décrits aux paragraphes suivants 1.3 et 1.4 (Extraction et Dosage des molécules de défense, p. 91 et p. 92).

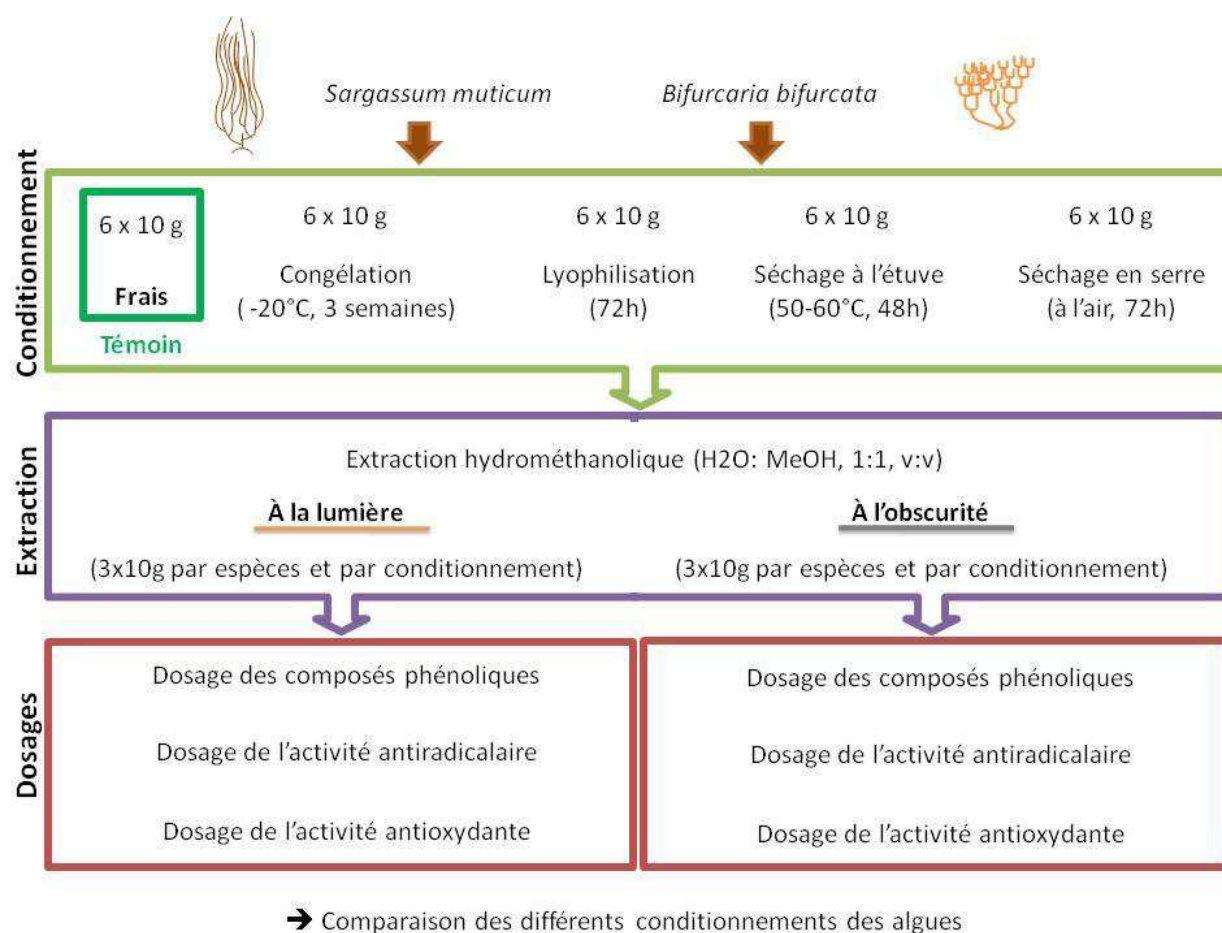


Figure 39 : Protocole utilisé pour étudier l'effet du conditionnement des algues sur les teneurs en composés phénoliques et les activités antiradicalaires et antioxydantes associées.

1.2. Suivis écologiques des populations

1.2.1. Échantillonnage en milieu tempéré

Les populations de Sargassaceae tempérées ont été étudiées sur deux sites du littoral finistérien (Figure 18, p. 48, Chapitre I) : la Pointe du Diable (N 48°21.255, W 4°33.510) et l'anse de Porsmeur (N 48°28.871, W 4°46.142).

Un suivi mensuel a été mis en place en décembre 2006. L'ensemble des individus appartenant respectivement à *Sargassum muticum*, *Bifurcaria bifurcata* et *Cystoseira baccata* présents au sein d'un même site, a été qualifié de **population**.

Le but de l'étude est le suivi de la population et ce, via l'échantillonnage aléatoire simple de quadrats. Un pré-échantillonnage a été effectué en novembre 2006 afin d'établir l'aire minimale (surface du quadrat à

utiliser) et la surface à échantillonner, soit le nombre de quadrats nécessaires pour obtenir la meilleure représentation possible de la population étudiée. L'aire minimale a été estimée à 0,25 m² pour *Sargassum muticum* par Plouguerné (2006) et nous l'avons vérifié pour les deux autres espèces. La détermination de la surface à échantillonner a consisté en le dénombrement des individus présents au sein de quadrats de surface de 0,25 m². Pour chaque site cette opération a été répétée 10 fois.

Le nombre de quadrats (Q) nécessaires a été calculé à l'aide de la formule d'Elliott (Plante et Le Loeuff 1983) où p représente la précision recherchée (qui a été ici choisie à 15 %) :

$$Q = (\text{variance}) / [(\text{moyenne})^2 * (p)^2]$$

Le nombre de quadrats par site et par espèce est présenté dans le Tableau 7. Les quadrats ont ensuite été disposés aléatoirement au sein des populations lors du suivi mensuel des populations.

Les variables mesurées sur les populations sont :

- pour *Sargassum muticum* et *Cystoseira baccata*, la densité, le taux de recouvrement, le nombre de latérales par individu, la longueur de la plus grande latérale, la présence ou non d'aérocystes et la maturité de chaque individu (présence ou non de réceptacles matures).
- pour *Bifurcaria bifurcata*, le taux de recouvrement, l'estimation du nombre d'individus, la longueur de l'axe le plus long pour chaque individu estimé, la présence ou non de réceptacles (maturité).

Rappel : *Bifurcaria bifurcata* est une algue dont la base n'est pas un disque mais un faux rhizome rampant et ramifié (Cabioc'h *et al.* 2006) ce qui rend le dénombrement des différent individus du quadrat difficile. La densité pour cette espèce est donc une estimation du nombre d'individus et non un réel dénombrement.

De plus pour chaque espèce, des indications sur l'état des individus sont relevées, à savoir les traces de broutage, la présence/absence et la nature des épiphytes et enfin, l'état général du thalle (latérales déchirées et/ou abîmées). Afin de caractériser le milieu environnant les populations algales, un suivi mensuel de la température de l'eau de mer et de l'air ainsi que de la salinité est effectué. Les données concernant la lumière nous ont été fournies par Thierry Cariou du Laboratoire de Chimie Marine de la Station Biologique de Roscoff et celles concernant les nutriments azotés et phosphatés par le Service d'Observation en Milieu Littoral (SOMLIT).

Tableau 7 : Nombre de quadrats utilisés par site pour chacune des espèces étudiées.

Site	Espèces	Nombre de quadrats (0,25 m ²)
Pointe du Diable	<i>Bifurcaria bifurcata</i>	3
	<i>Cystoseira baccata</i>	3
	<i>Sargassum muticum</i>	3
Anse de Porsmeur	<i>Bifurcaria bifurcata</i>	3
	<i>Cystoseira baccata</i>	3
	<i>Sargassum muticum</i>	3

Pour chaque site, un prélèvement ($\approx 150\text{g}$) est effectué mensuellement durant les 18 mois du suivi, pour chacune des espèces étudiées. Les algues sont nettoyées de leurs éventuelles épiphytes, rincées à l'eau distillée et essorées, puis différentes cartouches sont constituées.

- 3 cartouches de 5 g d'algues coupées sont mises à sécher à l'étuve jusqu'à obtention d'un poids constant afin d'estimer la matière sèche.
- 3 cartouches de 5 g d'algues coupées sont mises au congélateur (-25°C) puis utilisées afin d'extraire les composés phénoliques (extraits hydro-méthanoliques). Le reste, représentant une centaine de gramme, est conditionné au congélateur avant d'être lyophilisé.

N.B : Par manque de biomasse durant certains mois hivernaux (*Sargassum muticum*) ou par le trop fort épiphytisme des thalles au cours de quelques mois printaniers (*Cystoseira baccata*), aucun prélèvement n'a été fait.

1.2.2. Echantillonnage en milieu tropical

Les populations de Sargassaceae de milieu tropical ont été étudiées dans trois zones géographiques du Pacifique Sud : les îles Salomon au Nord, la Nouvelle Calédonie au Sud et les îles Fidji à l'Est (Figure 20, p. 51, Chapitre I). Ces 3 sites ont fait l'objet d'une campagne de récolte et l'échantillonnage des individus au sein des populations a été fait au hasard. Le Tableau 8 présente les espèces récoltées au sein de chacun des sites de prélèvement visité. La quantité d'algues récoltée variait en fonction des sites. Une fois prélevés, les échantillons ont été nettoyés, congelés, puis lyophilisés avant d'être expédiés en Métropole.

Tableau 8 : Espèces récoltées au sein de chaque archipel en fonction des sites de prélèvement.

<i>Archipel</i>	<i>Site de prélèvement</i>	<i>Date de récolte</i>	<i>Espèces récoltées</i>
Iles Salomon	Anuta Paina Island	18/07/04	<i>S. aquifolium</i> <i>S. cristaeifolium</i>
			<i>T. ornata</i> <i>T. decurrens</i>
	Lau Lagoon	16/07/04	<i>T. decurrens</i> <i>S. aquifolium</i>
		17/07/04	<i>T. conoides</i>
	Nggela NW	12/07/04	<i>T. conoides</i> <i>S. aquifolium</i>
Nouvelle Calédonie	Prony 1	13/06/07	<i>S. aquifolium</i>
	Prony 2	12/06/07	<i>S. aquifolium</i> <i>T. ornata</i>
	Ouiné	26/03/06	<i>T. ornata</i> <i>T. conoides</i>
Iles Fidji	Vanua Levu (Kakaulevu reef)	15/05/07	<i>T. ornata</i>
	Vanua Levu (Visogo)	16/05/07	<i>S. polycystum</i>
	Vanua Levu (Namukalau)	17/05/07	<i>S. polycystum</i>
	Ngau (Navukailagi)	24/05/07	<i>S. polycystum</i>

1.3.Extraction des molécules de défense

1.3.1. Extraction des composés phénoliques

Les composés phénoliques ont été extraits par un mélange méthanol : eau (50 : 50 , v : v) à raison de 3 g d'algue lyophilisée (soit environ 10 g de matériel frais) et grossièrement broyée pour 150 mL de solvant d'extraction. L'extraction a été réalisée à 40°C pendant 3 heures, sous agitation (60 t/m) et à l'abri de la lumière. Les extraits ont ensuite été centrifugés à 6500 g (Sigma 3K10, Osterode, Allemagne), filtrés sur coton de verre puis évaporés sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif (R-3000, Büchi, Flawil, Suisse). Le protocole d'extraction utilisé est celui décrit par Connan (2004).

1.3.2. Extraction de la fucoxanthine

L'extraction de la fucoxanthine a été réalisée d'après le protocole de van Leeuwe *et al.* (2006) qui permet l'extraction des pigments. Ainsi, 1 g d'algue lyophilisée a été broyé à l'ultraturax en présence de 50 mL de Méthanol 85 (méthanol : eau ultra pur, 85:15, v:v) tamponné avec du CH_3COON (concentration finale : 0,5 M) puis passé 2 fois 15 min aux ultrasons en chambre froide et à l'obscurité. Après filtration sur coton de verre, les extraits ont été placés en chambre froide (4 à 6°C). Les extraits réalisés via ce protocole sont nommés extraits pigmentaires.

1.4. Dosage des molécules de défense

1.4.1. Dosage des composés phénoliques

La teneur totale en composés phénoliques a été déterminée par colorimétrie en utilisant un protocole adapté du dosage Folin-Ciocalteu (Connan 2004) tel qu'il est décrit à la Figure 4. Cette technique est connue pour être moins sensible aux interférences, souvent dues à des composés tels que les acides aminés aromatiques (Sanoner *et al.* 1999). Néanmoins, chez les algues brunes, ces composés représentent moins de 5 % des composés réagissant avec le réactif de Folin-Ciocalteu (Toth et Pavia 2001b, Connan 2004).

Lors du dosage, l'absorbance est lue à 700nm (spectrophotometer Shimadzu UV 160A, Croissy, France), en utilisant le phloroglucinol (1,3,5-trihydrobenzene, Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) comme standard.

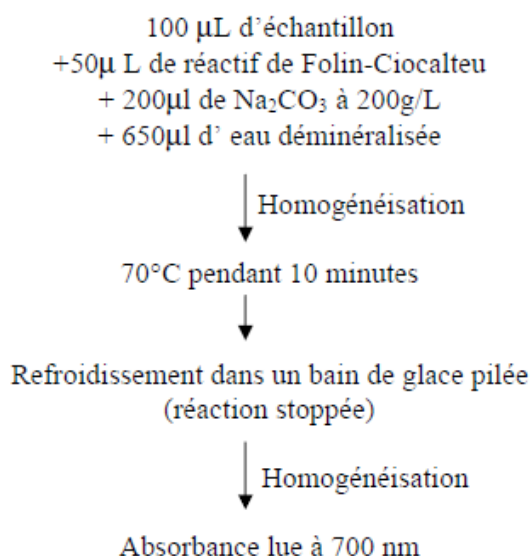


Figure 40 : Protocole de dosage des composés phénoliques selon la méthode de Folin-Ciocalteu d'après Connan (2004)

1.4.2. Mise au point du dosage de la fucoxanthine

Afin de doser la fucoxanthine, nous avons mis au point une méthode de dosage par HPLC de ce composé. Le standard de la fucoxanthine n'étant pas vendu dans le commerce, j'ai purifié cette molécule à partir d'un échantillon de *Sargassum muticum* (cf. Chapitre IV, §1.4.1 - Purification de la fucoxanthine p. 256). La méthode de dosage de la fucoxanthine a été adaptée de van Leeuwe *et al.* (2006) et de Airs *et al.* (2001). La colonne utilisée est une colonne en phase inverse de type C6 phenyl:Gemini - C6 phenyl (Phenomenex, 3 x 250 mm, 5 µm). L'appareillage utilisé est une chaîne Waters comprenant une pompe avec injecteur automatique (Waters 717 plus Autosampler) et un détecteur à barrette de diodes (Waters996, Photodiode Array Detector) permettant de mesurer l'absorbance sur un intervalle de longueurs d'onde. Les chromatogrammes sont ensuite traités à l'aide du logiciel Millenium 32 (Waters). Le solvant d'élution utilisé est un mélange de solvant composé à 60% de Méthanol 85 (méthanol : eau ultra pur , 85:15 , v:v) tamponné avec du CH₃COON (concentration finale : 0,5M) et à 40% d'Acétonitrile 90 (acétonitrile : eau ultra pure , 90:10 , v:v). Tous les solvants utilisés sont des solvants purs, qualité HPLC. Le volume d'injection est de 50 µL. Une analyse dure 35 min à une pression de 1250 psi environ et à un flux de 0,5mL/min. Le pic caractéristique de la fucoxanthine apparait après 10 min d'analyse (Figure 5).

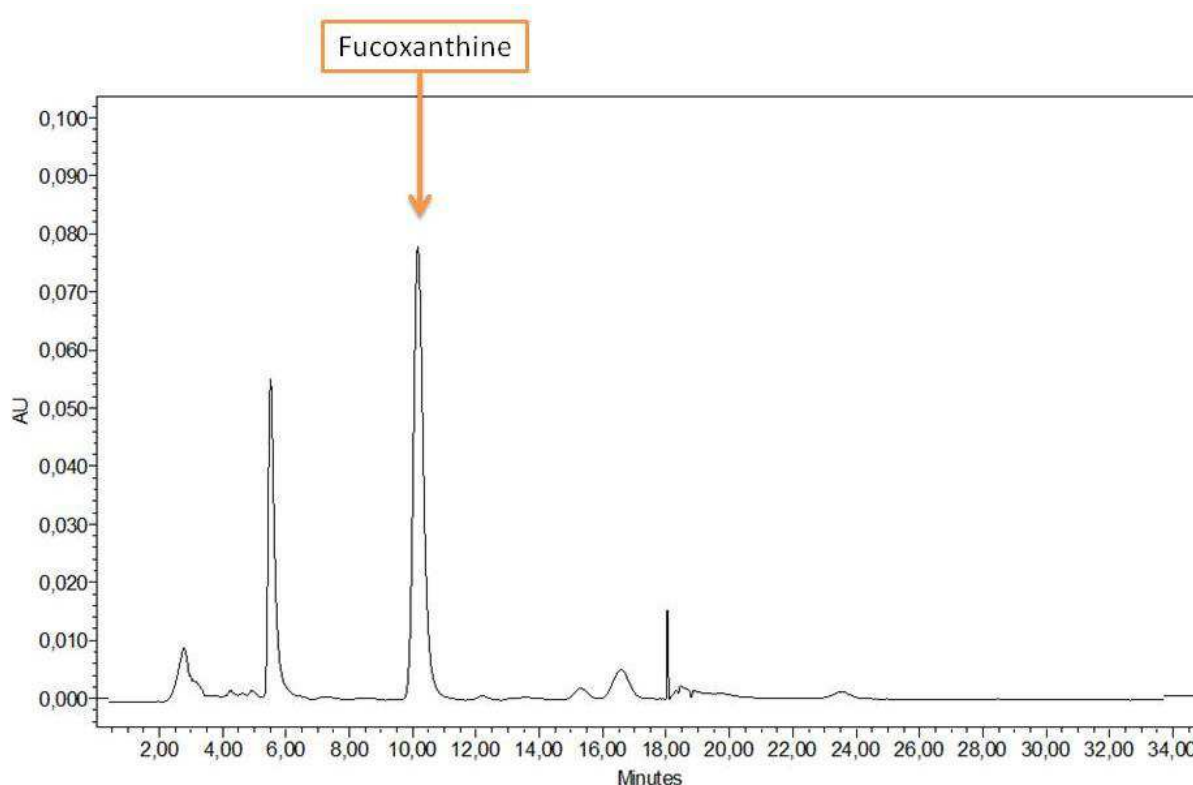


Figure 41 : Chromatogramme caractéristique d'un échantillon pigmentaire (méthanol : eau ultra pure (85:15 , v:v) tamponné avec du CH₃COON (concentration finale : 0,5 M)) de Sargassaceae (ici *Sargassum muticum* récoltée en avril 2008 à la Pointe du Diable). Le pic caractéristique de la fucoxanthine est indiqué par une flèche.

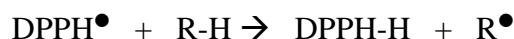
1.4.3. Dosage des activités antioxydantes

Parmi tous les tests existants, nous avons sélectionné deux tests qui ont l'avantage d'être simples et rapides. Il s'agit du **test du DPPH** qui permet d'estimer l'activité antiradicalaire totale et la **méthode du blanchiment du β -carotène** qui est un test permettant de déterminer l'activité antioxydante totale.

1.4.3.1. Détermination de l'activité anti-radicalaire par le test du DPPH

Cette méthode est basée sur l'utilisation d'un radical libre, stable en solution : le 2,2 diphenyl-1-1-1-1-tetraphenylhydrazyl ou DPPH (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France). Le principe du test DPPH est simple. Le DPPH est un radical libre qui est stable grâce à la délocalisation de l'électron libre au niveau de la molécule. De ce fait, la molécule ne dimérise pas, c'est-à-dire qu'elle ne s'associe pas avec elle-même. Le DPPH, de couleur violette dans son état radicalaire est alors électrophile. Lorsqu'il rentre en contact avec une molécule nucléophile ou possédant des atomes d'hydrogène, il se produit une réaction, décrite ci-dessous, ainsi le DPPH est réduit et sa couleur devient jaune pâle.

La réduction du DPPH peut être représentée comme suit :



Au cours de ces travaux de thèse, nous avons utilisé le test du DPPH de deux façons. Tout d'abord via une méthode classique de dosage colorimétrique par spectrophotométrie et d'autre part via une méthode de pulvérisation du réactif sur plaque de chromatographie sur couche mince. Ces deux méthodes sont décrites ci-après.

1.4.3.1.1. Dosage de l'activité antiradicalaire par spectrophotométrie.

Le dosage par spectrophotométrie du DPPH sur microplaque est adapté du protocole préalablement décrit par Connan (2004). Ainsi, 200 μL de solution de DPPH à $3,58 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ et 20 μL d'échantillons à tester (extraits algaux ou témoins) sont déposés dans les puits de la microplaque. La plaque est ensuite doucement agitée à la main et stockée pendant une heure à température ambiante et à l'obscurité. La lecture de la microplaque s'effectue ensuite à 540 nm. Afin de comparer les extraits entre eux, l'indice IC 50 est calculé. Il correspond à la quantité en mg de composés phénoliques nécessaire pour obtenir environ 50% d'inhibition. Les témoins positifs utilisés sont le BHA (2(3)-*t*-Butyl-4-hydroxyanisole, Sigma, Saint Quentin Fallavier, France), le BHT (2,6-Di-*tert*-butyl-4-methylphenol, Sigma, Saint Quentin Fallavier, France), l' α -

tocophérol (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) et l'acide ascorbique (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France). L'eau déionisée et le méthanol ont été utilisés comme témoins négatifs. Le passage de la couleur violette à la couleur jaune de la solution est mesurable par spectrophotométrie à 540 nm. L'absorbance lue est ensuite transformée en pourcentage d'inhibition par rapport à l'absorbance de la solution témoin. La courbe traçant la relation entre le pourcentage d'inhibition et la teneur en composés phénoliques n'étant pas linéaire mais logarithmique (plateau atteint vers 80% d'inhibition), les extraits sont donc dilués pour obtenir un pourcentage d'inhibition compris entre 30 et 70% (Connan, 2004). Afin de comparer les extraits entre eux, l'indice IC 50 est calculé. Il correspond à la quantité en mg de composés phénoliques nécessaire pour obtenir environ 50% d'inhibition. Ce test antioxydant est réalisé sur microplaque ce qui permet une utilisation moindre des réactifs ainsi qu'un gain de temps. Néanmoins, ce test n'est pas quantitatif, il permet seulement de comparer différents extraits entre eux selon leur capacité à piéger le DPPH en tant que radical libre, et ainsi d'apprécier indirectement les variations qualitatives des composés phénoliques.

1.4.3.1.2. Estimation de l'activité antiradiacalaire sur plaque CCM

Afin d'estimer le pouvoir antiradicalaire des extraits pigmentaires, les extraits sont déposés sur des plaques de silice puis une solution de DPPH à 80µg/mL est pulvérisée. Les plaques de silice sont mises à l'abri de la lumière pendant un quart d'heure voire une demi-heure, le temps que la réaction s'effectue. Ce protocole est modifié de Prabhakar *et al.* (2006).

1.4.3.2. Détermination de l'activité antioxydante par la méthode des β -carotène sur microplaque

Cette méthode est basée sur la perte de la couleur jaune du β -carotène due à la réaction avec des radicaux qui sont formés par l'oxydation de l'acide linoléique en émulsion (Marco 1968). Le protocole utilisé est modifié de Koleva *et al.* (2002) et de Kaur et Kapoor (2002).

Ainsi, 1 mg de poudre de β -carotène est dissout dans 100 mL de chloroforme. Ensuite, 2 mL de cette solution sont prélevés et 20 mg d'acide linoléique et 200 mg de Tween 40 sont ajoutés à ces 2 mL. Le chloroforme est ensuite éliminé à l'évaporateur rotatif. Puis, 50 mL d'eau distillée oxygénée est ajouté et le mélange est bien homogénéisé afin de former une émulsion. Au niveau de la microplaque, 12 µL d'échantillons à tester (extrait ou témoin) sont déposés dans les puits avec 180 µL de l'émulsion préalablement effectuée. L'absorbance est de suite mesuré à 450 nm puis de nouveau après 2h d'incubation

de la plaque en étuve à 50°C. Les témoins positifs utilisés sont le BHA (2(3)-*t*-Butyl-4-hydroxyanisole, Sigma, Saint Quentin Fallavier, France), le BHT (2,6-Di-*tert*-butyl-4-methylphenol, Sigma, Saint Quentin Fallavier, France), l'α-tocophérol (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) et l'acide ascorbique (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France). L'eau déionisée et le méthanol ont été utilisés comme témoins négatifs.

L'activité antioxydante peut être alors décrite par un rapport, appelé AAC :

$$AAC = \frac{(DO_{\text{éch 120min}} - DO_{\text{blanc 120min}})}{(DO_{\text{blanc 0min}} - DO_{\text{blanc 120min}})} \times 1000$$

Néanmoins, la comparaison entre échantillon est impossible, car la quantité de matière testée n'est pas exprimée. Un indice a alors été créé : l'IC 700 (Le Lann *et al.* 2008a). En effet, la valeur de l'AAC pour les témoins positifs tels que le BHA et le BHT est d'environ 700. L'IC 700 correspond alors à la quantité nécessaire pour obtenir un AAC de 700.

$$IC700 = \frac{700 \times AAC \text{ échantillon}}{[\text{échantillon}]}$$

1.5.Séparation des classes de taille des composés phénoliques

Une des méthodes simples de semi-purification des composés phénoliques est la dialyse (Connan 2004). Cette méthode est basée sur la séparation des molécules selon leur taille. Des membranes de cellulose à seuil de coupure à 2 000 Da (daltons), 5 000 Da et entre 12 000 et 14 000 daltons (Da) ont été utilisées.

Le principe de cette méthode est le suivant : les membranes ou boudins de dialyse (Spectrum Laboratories Inc.) sont remplis de l'extrait et sont plongés dans un grand volume d'eau renouvelée régulièrement. Les molécules de tailles inférieures au seuil de coupure (2 000, 5 000 ou 12 -14 000 Da) passent au travers de la membrane par diffusion et les plus grandes restent donc dans le boudin de dialyse.

Ainsi, afin d'obtenir différentes fractions de taille des composés phénoliques, chaque extrait subit trois dialyses :

-la première avec une membrane dont les pores font 2 000 Da.

- la deuxième avec un boudin à seuil de coupure de 5 000 Da
- la troisième avec une membrane aux pores de taille 12-14 000 Da.

Entre chaque dialyse, un dosage des composés phénoliques est effectué (méthode de Folin-Ciocalteu) pour suivre l'évolution des teneurs au cours du fractionnement et ainsi obtenir des informations sur leur taille et donc leur degré de polymérisation.

Un volume de l'échantillon à traiter (extrait ou fraction phénoliques) est enfermé entre les membranes de dialyse formant ainsi un boudin de dialyse (Figure 42).

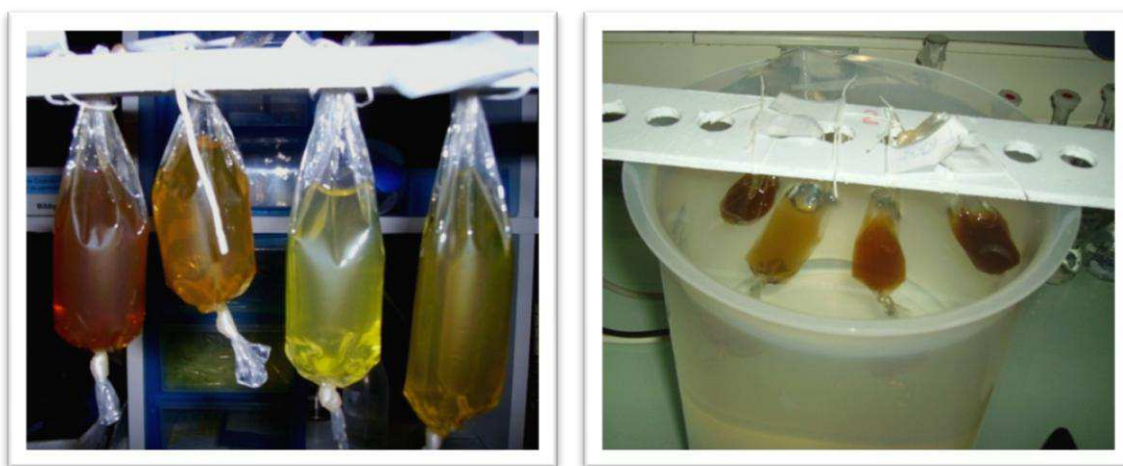


Figure 42 : Boudins de dialyse suspendus (photographie de gauche) et plongés dans un grand volume d'eau déionisée (photographie de droite).

La première dialyse se réalise en deux étapes :

- (1) une dialyse en circuit ouvert ou « Running Tape Water » qui dure 20 heures, à l'obscurité et à 12°C, durant laquelle l'eau du robinet est renouvelée en permanence autour des boudins de dialyse.
- (2) une dialyse en circuit fermé, dans de l'eau distillée sous agitation, à l'obscurité et en chambre froide, qui dure 18 heures et durant laquelle l'eau déionisée est renouvelée 3 fois. Le volume final du boudin (ou concentrât) est recueilli, noté puis remis dans un autre boudin de dialyse aux pores plus grands. Ces étapes sont ensuite répétées à l'identique jusqu'à la dernière dialyse. A chaque étape, un aliquot du concentrât recueilli est prélevé pour le dosage des teneurs en composés phénoliques (Figure 43).

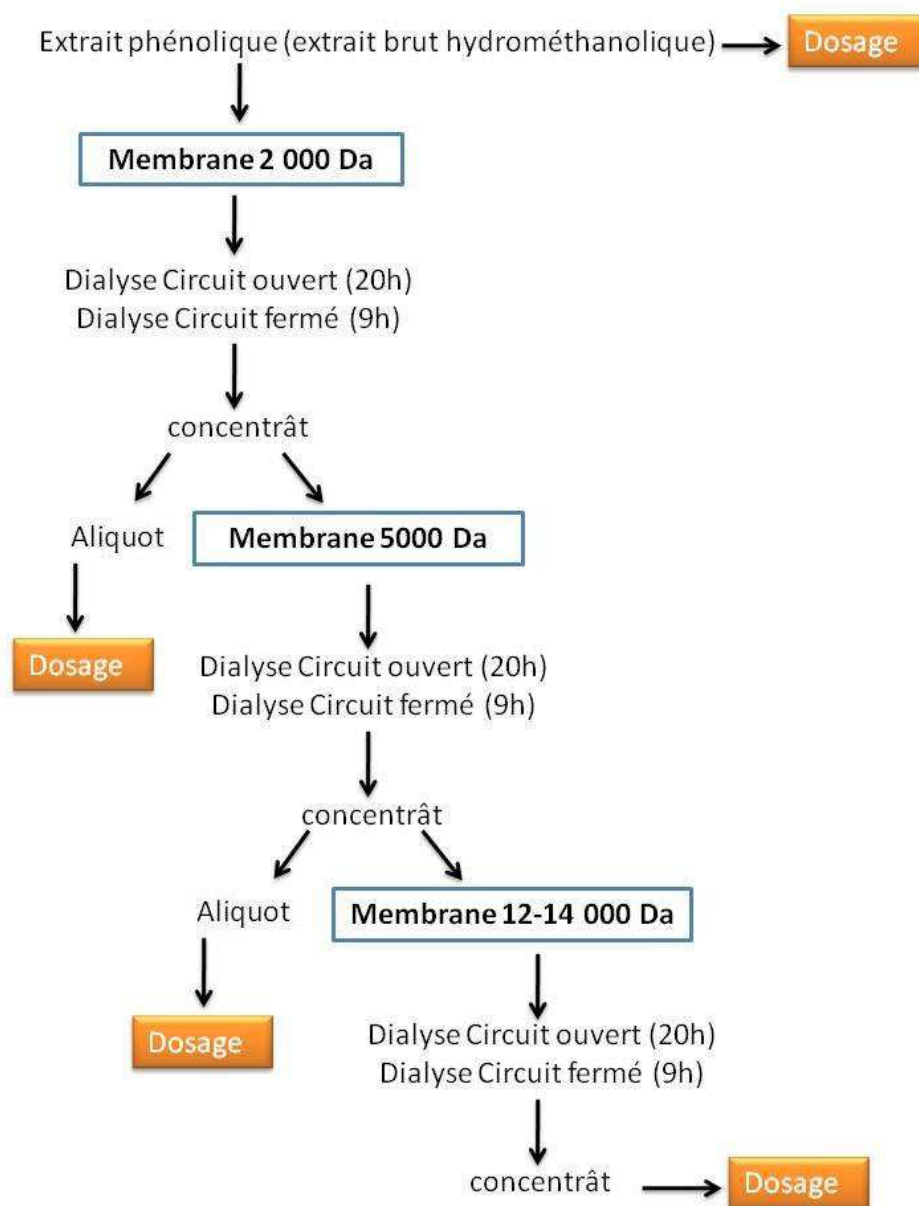


Figure 43: Protocole de séparation des classes de taille des composés phénoliques.

Toutes ces étapes se déroulent à l'obscurité afin de limiter la dégradation des composés phénoliques, connus pour être photosensibles. L'étude du pool de composés phénoliques a été effectuée sur les extraits hydro-méthanoliques de tous les échantillons en provenance du Pacifique Sud (suivi spatial) et des sites bretons (suivi spatio-temporel).

1.6. Analyses statistiques

Les analyses statistiques sont réalisées en utilisant le logiciel STATISTICA 7.1 pour PC. L'homogénéité des variances est testée via le test de Cochran (au seuil de signification de 95%). Afin de tester l'influence des divers facteurs sur les variables dépendantes (par exemples les teneurs en composés phénoliques ou les teneurs en fucoxanthine) une ANOVA à un ou plusieurs facteurs est effectuée.

Si l'homogénéité des variances n'est pas respectée, une transformation des données a lieu via un « arcsinus de la racine » des données. Si malgré cette transformation, les variances ne sont toujours pas homogènes, un test non paramétrique de Krukall-Wallis est effectué. Lors de tests significatifs, le test de Turkey ou test HSD est utilisé comme test *a posteriori* afin de visualiser les différences significatives entre les différents lots.

Les corrélations entre les diverses données sont testées, quand il y a lieu, via le test de Pearson.

2. Résultats

2.1. Optimisation du conditionnement en vue du démarrage de l'étude des composés phénoliques et de l'activité antioxydante associée

Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'une publication dans **Phycological Research**. La référence de cet article, présenté p 100, est :

Le Lann K, Jegou C & V Stiger-Pouvreau (2008) Effect of different conditioning treatments on total phenolic content and antioxidant activities in two Sargassacean species: Comparison of the frondose *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt and the cylindrical *Bifurcaria bifurcata* R. Ross. Phycological Research **56**(4): 238-245.

Les résultats ont montré que seules la congélation et la lyophilisation permettaient d'obtenir des teneurs en composés phénoliques (CP), ainsi que des activités antioxydante des extraits, proches de celles obtenues sur du matériel frais. L'étuve et le séchage à l'air dégradent les composés phénoliques, les teneurs et les activités obtenues étant beaucoup plus faibles que celles obtenues en utilisant des échantillons frais. Au cours de cette étude, nous avons également vérifié l'impact de l'exposition à la lumière lors de l'extraction sur les teneurs en CP.

Effect of different conditioning treatments on total phenolic content and antioxidant activities in two Sargassacean species: Comparison of the frondose *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt and the cylindrical *Bifurcaria bifurcata* R. Ross

Klervi Le Lann,* Camille Jégou and Valérie Stiger-Pouvreau

Laboratory of Ecophysiology and Biotechnology of Halophytes and Marine Algae (LEBHAM EA 3877), European Institute of Marine Studies, University of Western Brittany, Place Nicolas Copernic, Plouzané, France

SUMMARY

The effects of different conditioning treatments (fresh, freezing, freeze-drying, oven-drying and greenhouse-drying) on the total phenolic content (TPC) and antioxidant activities of two brown algae, *Sargassum muticum* and *Bifurcaria bifurcata*, were investigated and compared. Phenolic compounds were extracted in a methanol/water (50:50) solution, and TPC was measured by the colorimetric Folin-Ciocalteu assay. Antioxidant activity was assessed by the DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging assay and the β -carotene bleaching method. The dried seaweeds showed lower phenolic contents and lower antioxidant capacities than the fresh and frozen ones, which suggests that the phenolic content and antioxidant activities are decreased by the drying treatments, especially, oven- and greenhouse-drying. Relationships between TPC, antioxidant properties and conditioning treatments are discussed.

Key words: antioxidant activities, drying procedure, Phaeophyceae, phenolic compounds, Sargassaceae.

INTRODUCTION

Phenolic compounds, or phlorotannins, are metabolites present in variable quantities in every brown alga. Over the last five decades, these compounds have been the subject of many studies. They play a primary role as integral structural components of cell-walls (Schoenwaelder & Clayton 1998), and are additionally involved in interactions with the biotic and/or the abiotic environment (Koivikko *et al.* 2005). Published reports show that the production of phenolic compounds on marine algae is usually associated with a chemical defense against grazers, bacterial, fungal, larval colonizations and epiphytism (Ragan & Glom-

bitza 1986). Moreover, these compounds exhibit anti-oxidative properties (Nakai *et al.* 2006; Kuda *et al.* 2007; Kumar Chandini *et al.* 2008). Thus, whenever the extraction of phenolic compounds from freshly collected thalli cannot be carried out immediately, the conditioning of plants has to be optimized to prevent compounds and associated activities from degrading. Various methods of conservation are available for algae: freezing, freeze-drying, drying in a steam room or in the sun. Seaweeds, especially edible algae, are traditionally and commonly sun- or air-dried. Usually, drying at high temperature (like oven-drying) causes complex physical degradations and losses of volatile compounds in plant material (Wong & Cheung 2001). Freeze-drying appears to efficiently preserve thermosensitive compounds (Franks 1998). The nutritional composition of *Sargassum* sp. in amino acids, proteins, fatty acids, minerals and vitamin C (Chan *et al.* 1997; Wong & Cheung 2001) can be negatively affected by drying methods.

Among the seaweed groups settled in temperate regions, Phaeophyceae are the most abundant; within this group, the family of Sargassaceae accounts for nearly 400 species distributed among intertidal and shallow subtidal substrata of the temperate, tropical and subtropical coastal waters. Along the coasts of Brittany (France) the most accessible species of Sargassaceae are *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt and *Bifurcaria bifurcata* R. Ross. As both are widespread in this area, the huge amount of sustainable resource constituted by their biomass is worth being used in cosmetic and pharmaceutical industries.

*To whom correspondence should be addressed.

Email: klervi.lelann@univ-brest.fr

Communicating editor: U. Karsten.

Received 24 November 2007; accepted 14 April 2008.

doi: 10.1111/j.1440-1835.2008.00505.x

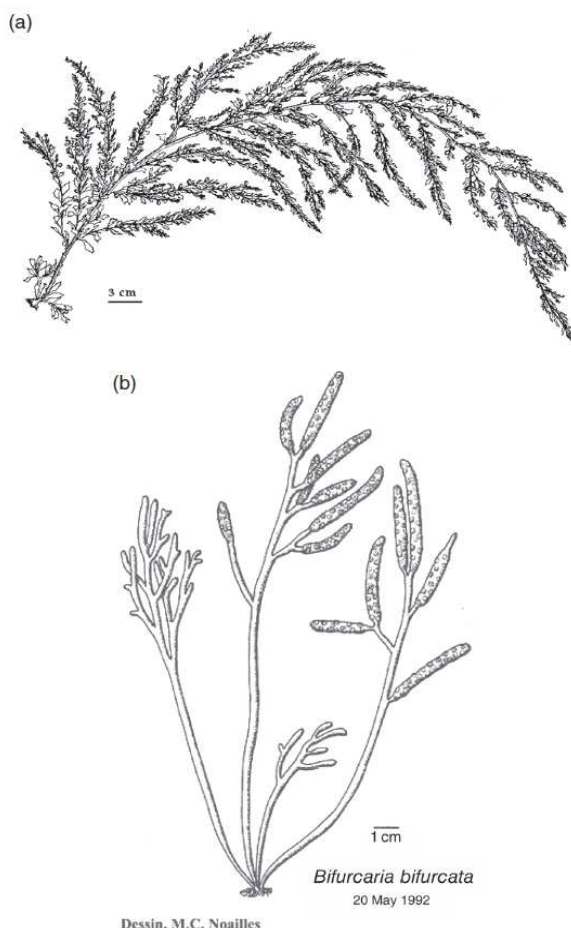


Fig. 1. Presentation of the morphology of the two Sargassaceae species. (a) Picture of the frondose thallus of *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt (from <http://www.ucjeps.berkeley.edu/guide/brown83.html>) (b) Picture of the cylindrical thallus of *Bifurcaria bifurcata* R. Ross (from <http://www.sb-roscoff.fr/INVENTAIRES>).

Marine algae are also currently considered as a good source of antioxidants (Nagai & Yukimoto 2003). All of these considerations led us to carry out tests aimed at determining which, among the current drying treatments, would only slightly affect the phenolic contents and antioxidant activities of these algae. Although both taxa belong to the same family, *S. muticum* is considered as a frondose species, whereas *B. bifurcata* is classified as a cylindrical species because of their different morphologies (Fig. 1). Therefore, another goal was to evaluate whether the phenolic contents and the antioxidant activities are dependent upon conditioning treatments, which may correlate with the morphological differences.

MATERIALS AND METHODS

Organisms studied and sample preparation

In July 2007 samples from *Sargassum muticum* and *Bifurcaria bifurcata* were collected at the Pointe du Diable, Plouzané (Brittany, France), a rocky and exposed field site (Plouguerné *et al.* 2006), where these two perennial species grow in the same habitat in rock pools on the low and middle tidal zones at the sea–air interface. *S. muticum* growth is seasonal, and the length of individuals can exceed 70 cm in July (Plouguerné *et al.* 2006; Le Lann, unpubl. data, 2007). At the same period, the length of *B. bifurcata* is 50–60 cm (Le Lann, unpubl. data, 2007). In rock pools both species grow by spreading at the water surface to make a canopy-like structure mainly in the spring and summer months (Le Lann, pers. comm. 2007).

During the collection of thalli, only the apical and median parts of the thalli were retained and the hold-fast was left in place to minimize the collecting impact on seaweed populations.

Immediately after collection, the seaweeds were thoroughly washed with distilled water, and their epiphytes were removed. The cleaned algal materials were chopped into fragments, and no tissue was discarded. The resulting pieces were then homogenized to reduce any intra- and interindividual variabilities in phenolic content. Finally and prior to phenolic extraction, the mixed tissues were subsampled into five batches of six samples of 10 g of fresh weight (FW) each. Depending on the batches the conditioning treatments were: (i) oven-drying at 50–60°C for 48 h (OD), (ii) freeze-drying for 72 h (FD), (iii) greenhouse-drying for 72 h (GD) and (iv) freezing at –20°C for 3 weeks (Fz). Fresh algae are referred to as Fh.

Due to the high frequency of windy and rainy weather in Brittany, tissue samples were dried in a greenhouse instead of by direct exposure to the sun. The greenhouse was equipped with a ventilation system, and the inner temperatures were 15°C in the night and up to 30°C in the middle of the afternoon. The average relative humidity was 66%, and the average photon fluence rate (PAR) was 110 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ including UV radiation.

Phenolic extraction and assay

Phenolic compounds were extracted in a methanol/water (50:50; v/v) mixture at 40°C for 3 h under rotary agitation (60 rpm). The samples were centrifuged at 6500 g (Sigma 3K10, Osterode, Germany) and evaporated at 40°C under vacuum with a Rotavapor system (R-3000, Büchi, Flawil, Switzerland). For each group (Fh, OD, FD, GD and Fz), extractions were carried out in

triplicate either in dim light or under ambient light conditions in the laboratory.

The total phenolic contents were colorimetrically determined (spectrophotometer Shimadzu UV 160A, Croissy, France) with an adapted Folin–Ciocalteu assay (Sanoner *et al.* 1999), which is known to be less affected by interfering compounds. Interfering substances, however, are thought to account for less than 5% of the Folin–Ciocalteu-reactive compounds in brown seaweeds (Toth & Pavia 2001). Phloroglucinol (1,3,5-trihydroxybenzene, Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) was used as a standard, and concentrations were determined in each extract by drying three aliquots of 500 μL at 50–60°C for 48 h. Total phenolic contents (TPCs) are expressed as percentages of phenolic compounds per dry weight (DW).

Antioxidant activity determination by DPPH radical scavenging assay

The DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging assay modified according to Connan *et al.* (2006) and Turkmen *et al.* (2007) was used to determine the antiradical activities in Sargassaceae extracts and butylated hydroxyl-anisole (BHA) and butylated hydroxyl-toluene (BHT) (respectively 2(3)-*t*-Butyl-4-hydroxyanisole and 2,6-Di-*tert*-butyl-4-methylphenol, Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) were used as positive controls. Briefly, various dilutions of the extracts were prepared in triplicate before addition to 20 μL aliquots of 3.58×10^{-3} M of DPPH radical (200 μL). The mixture was stored in the dark for 60 min prior to absorbance measurement at 540 nm. Distilled water was used as a negative control. All samples were assayed in triplicate. Antioxidant activity was expressed as IC50 (the concentration of substrate that causes a 50% loss of the DPPH activity). A high IC50 is considered as indicative of a weak antioxidant activity and *vice-versa*.

Antioxidant activity determination by the β -carotene bleaching method

The antioxidant activity of extract samples and controls was measured by the β -carotene bleaching method modified in accordance with Koleva *et al.* (2002) and Kaur & Kapoor (2002). Briefly, 2 mL of a β -carotene solution in chloroform (0.1 mg mL^{-1}) were added to round-bottom flasks containing 20 mg of linoleic acid and 200 mg of Tween 40. After evaporation with a rotavapor, oxygenated distilled water (50 mL) was added, and the mixture was shaken to form a liposome solution. This mixture was added to 12 μL of extracts, or positive controls (BHA and BHT), or negative controls (distilled water and ethanol). The absorbance of the solution at 450 nm was measured immediately

($t = 0$ min) and after 2 h at 50°C ($t = 120$ min). All samples were assayed in triplicate. Antioxidant activity was expressed through the antioxidant activity coefficient (AAC) as follows:

$$\text{AAC} = [(A_{s120} - A_{c(120)}) / (A_{c(0)} - A_{c(120)})] \times 1000$$

where $A_{s(120)}$ is the absorbance of the antioxidant mix at $t = 120$ min, $A_{c(120)}$ is the absorbance of the control at $t = 120$ min, and $A_{c(0)}$ is the absorbance of the control at $t = 0$ min. Since, the positive controls, BHA and BHT, had an average AAC of 700, this value was arbitrarily chosen to express the antioxidant activity as IC700. IC700 is then the concentration of substrate needed to obtain an AAC value of 700. Furthermore, the lower IC700, the stronger the antioxidant activity is.

Statistics

All analyses were carried out in triplicate, and their results are presented as mean values \pm standard deviation (SD). The software 'Statistica 6' for PC was used for statistical analysis. Homogeneity of variance was tested with the Cochran test at the 0.05 significance level. When even after transformation the data did not satisfy the ANOVA requirements, they were tested with the non-parametric Kruskal-Wallis test before using the Fisher least significant difference (LSD) at $P < 0.05$ to detect significant differences between groups.

RESULTS

Impact of conditioning on TPC

Figure 2 and Tables 1–3 illustrate the effect of the different conditioning treatments on the TPCs extracted from algal samples indicating that the highest TPCs are found in Fh extracts ($5.83 \pm 0.12\%$ DW and $4.47 \pm 0.12\%$ DW at $P < 0.001$, in *S. muticum* and *B. bifurcata*, respectively); on the other hand, the lowest ones are in GD extracts ($0.81 \pm 0.12\%$ DW and $1.46 \pm 0.12\%$ DW at $P < 0.001$ in *S. muticum* and *B. bifurcata*, respectively). In *S. muticum*, the TPC is more affected by OD or GD treatment than the one in *B. bifurcata*: for example, in *S. muticum* the difference in TPCs between Fh and GD is $5.02 \pm 0.12\%$ DW against only $3.01 \pm 0.11\%$ DW in *B. bifurcata* (Fig. 2).

In another respect, whatever the pre-extraction conditioning, TPCs in extracts from *S. muticum* were significantly higher than in *B. bifurcata* ones ($P = 0.007$) ($5.83 \pm 0.12\%$ DW in the dark and $5.30 \pm 0.12\%$ DW under light for *S. muticum* against $4.47 \pm 0.12\%$ DW in the dark and $3.59 \pm 0.12\%$ DW under light for *B. bifurcata*). In both species, neither FD extracts, nor

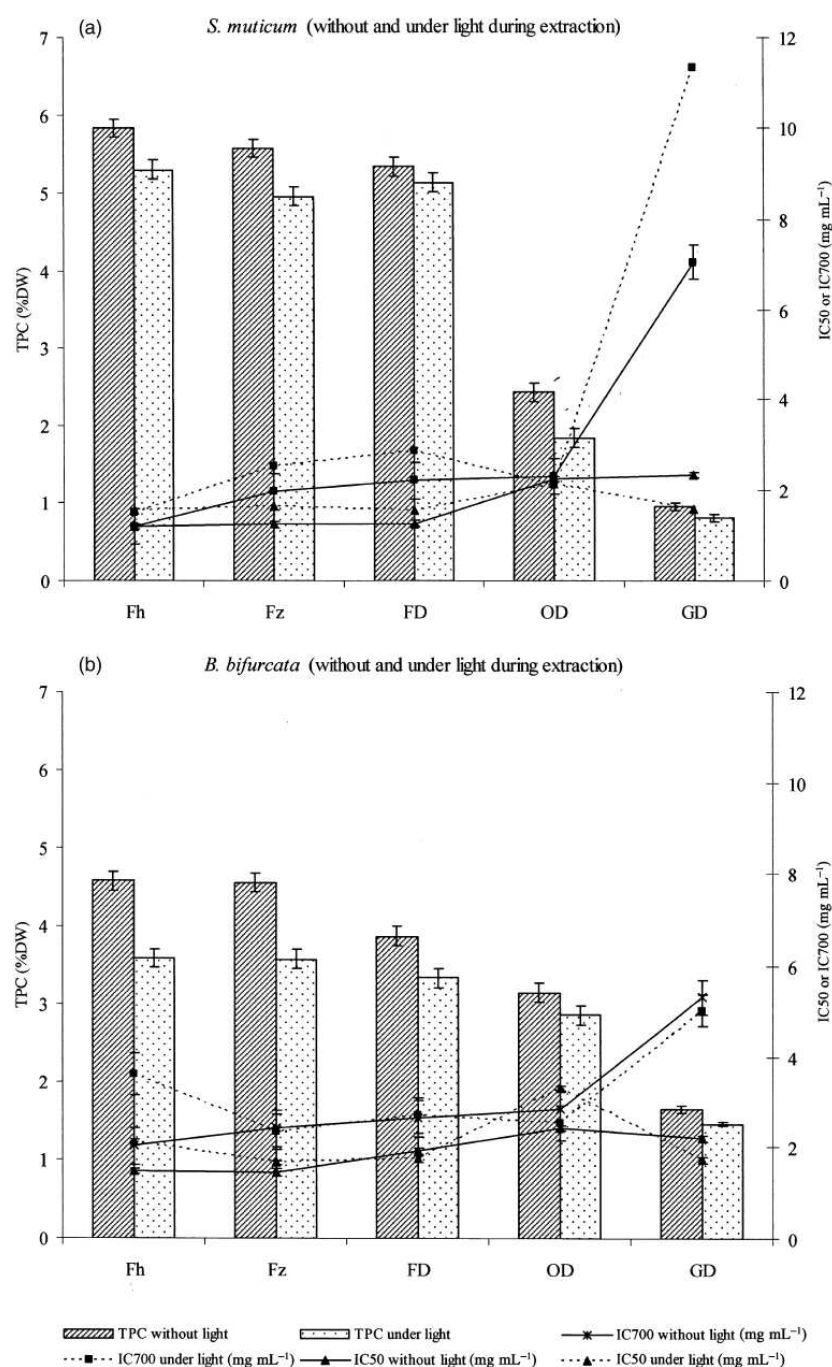


Fig. 2. Total phenolic content (TPC) in samples from *Sargassum muticum* (a) and *Bifurcaria bifurcata* (b) and antioxidant activities measured with DPPH (IC50) and the β -carotene bleaching method (IC700) according to the different conditioning treatments (FD, freeze-dried; Fh, fresh; Fz, frozen; GD, greenhouse-dried; OD, oven-dried), in the dark (without light) and under natural light (under light).

Fz ones proved to have a TPC significantly different from the one in Fh extracts ($P < 0.001$). Concerning the extraction procedure, for *S. muticum* the presence or lack of light caused no significant difference in TPC

($P = 0.146$) conversely to *B. bifurcata*, where extraction under natural light induced a fall in TPC compared with the amount found after extraction in the dark ($P < 0.001$) (Tables 2,3 and Fig. 2).

Table 1. Statistical analysis: variations in total phenolic content (TPC), antiradical activity (IC₅₀, DPPH test) and antioxidant activity (IC₇₀₀, β -carotene bleaching test) in hydromethanolic extracts from the two alga species: *Bifurcaria bifurcata* (Bb) and *Sargassum muticum* (Sm)

Variables	Statistical tests	Fixed factors Species	Pre-extraction conditioning	Extraction conditioning
TPC (% DW)	Kruskall-Wallis and LSD Fisher	H = 7.28 P = 0.007 Bb < Sm	H = 136.56 P < 0.001 GD < OD < FD = Fz < Fh	H = 4.42 P = 0.35
IC 50 (mg mL ⁻¹)		H = 6.67 P = 0.009 Bb > Sm	H = 95.07 P < 0.001 GD > OD > FD \geq Fz = Fh	H = 2.94 P = 0.086
IC 700 (mg mL ⁻¹)		H = 0.9 P = 0.342	H = 88.49 P < 0.001 GD > OD = FD = Fz \geq Fh	H = 3.96 P = 0.05

Pre-extraction conditioning: FD, freeze-dried; Fh, fresh; Fz, frozen; GD, greenhouse-dried; OD, oven-dried. Extraction conditioning: UL, under natural light; WL, without light (i.e. in the dark). DW, dry weight; DPPH, 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; LSD, least significant difference.

Table 2. Statistical analysis: variations in total phenolic content (TPC), antiradical activity (IC₅₀, DPPH test) and antioxidant activity (IC₇₀₀, β -carotene bleaching test) in hydromethanolic extracts from *Bifurcaria bifurcata* (Bb)

Variables	Statistical tests	Fixed factors Pre-extraction conditioning	Extraction conditioning
TPC (% DW)	Kruskall-Wallis and LSD Fisher	H = 74.02 P < 0.001 GD < OD < FD = Fz \leq Fh	H = 15.57 P < 0.001 UL < WL
IC 50 (mg mL ⁻¹)		H = 68.67 P < 0.001 OD > GD = FD = Fh \geq Fz	H = 3.98 P = 0.046 UL > WL
IC 700 (mg mL ⁻¹)		H = 45.44 P < 0.001 GD > OD \geq FD \geq Fh \geq Fz	H = 1.16 P = 0.281

Pre-extraction conditioning: FD, freeze-dried; Fh, fresh; Fz, frozen; GD, greenhouse-dried; OD, oven-dried. Extraction conditioning: UL, under natural light; WL, without light (i.e. in the dark). DW, dry weight; DPPH, 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; LSD, least significant difference.

Table 3. Statistical analysis: variations in total phenolic content (TPC), antiradical activity (IC₅₀, DPPH test) and antioxidant activity (IC₇₀₀, β -carotene bleaching test) in hydromethanolic extracts from *Sargassum muticum* (Sm)

Variables	Statistical tests	Fixed factors Pre-extraction conditioning	Extraction conditioning
TPC (% DW)	Kruskall-Wallis and LSD Fisher	H = 62.56 P < 0.001 GD < OD < FD = Fz = Fh	H = 2.11 P = 0.146
IC 50 (mg mL ⁻¹)		H = 43.62 P < 0.001 OD < GD < FD = Fz = Fh	H = 0.39 P = 0.531
IC 700 (mg mL ⁻¹)		H = 60.10 P < 0.001 GD < OD = FD = Fz = Fh	H = 3.49 P = 0.061

Pre-extraction conditioning: FD, freeze-dried; Fh, fresh; Fz, frozen; GD, greenhouse-dried; OD, oven-dried. Extraction conditioning: UL, under natural light; WL, without light (i.e. in the dark). DW, dry weight; DPPH, 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; LSD, least significant difference.

Effect of conditioning on antioxidant activities

According to the DPPH test, the antioxidant activity (IC₅₀) in the Fh ($1.45 \pm 0.051 \text{ mg mL}^{-1}$), Fz ($1.58 \pm 0.063 \text{ mg mL}^{-1}$) and FD ($1.64 \pm 0.062 \text{ mg mL}^{-1}$) extracts were lower ($P < 0.001$) than those in OD and GD extracts ($2.59 \pm 0.063 \text{ mg mL}^{-1}$ and $2.95 \pm 0.061 \text{ mg mL}^{-1}$, $P < 0.001$, respectively). Whatever the conditioning treatments, IC₅₀ in *S. muticum* extracts was lower than in *B. bifurcata* ($1.68 \pm 0.059 \text{ mg mL}^{-1}$ against $1.91 \pm 0.051 \text{ mg mL}^{-1}$, $P = 0.009$). In both species, IC₅₀ showed no significant difference between either FD or Fz and Fh (Tables 2,3, Fig. 2). The scavenging activity in extracts from *S. muticum* was unaffected by natural light ($P = 0.531$) (Table 2); on the other hand, in *B. bifurcata* extracts, natural light affected the scavenging activity (IC₅₀ = $2.33 \pm 0.08 \text{ mg mL}^{-1}$ against $1.92 \pm 0.08 \text{ mg mL}^{-1}$ in the dark at $P < 0.001$) (Table 3). The antioxidant activity determined by the β -carotene bleaching method (IC₇₀₀) was the highest in GD extracts ($6.40 \pm 0.22 \text{ mg mL}^{-1}$ at $P < 0.001$) (Table 1, Fig. 2). Whatever the conditioning treatments, no significant differences in IC₇₀₀ values was found between *B. bifurcata* and *S. muticum* ($3.22 \pm 0.19 \text{ mg mL}^{-1}$ and $3.10 \pm 0.2 \text{ mg mL}^{-1}$, respectively, at $P = 0.342$). Moreover, in both species, neither FD extracts, nor Fz ones proved to have an IC₇₀₀ significantly different from the one in Fh extracts. A similar observation was made about the conditions of extraction: in both species, no significant difference was found in IC₇₀₀ values between extractions under light or in the dark (Tables 2,3).

DISCUSSION

This study showed a significant effect by conditioning treatments on the TPC and antioxidant activities in extracts from two kinds of morphologically different Sargassaceae (*S. muticum* and *B. bifurcata*). Indeed, in both species TPCs were significantly reduced by OD and GD treatments. This finding is in agreement with evidence provided by other authors about a significant decrease in the TPC of higher plants (Toor & Savage 2006; Lim & Murtijaya 2007) and seaweeds (Jiménez-Escrig *et al.* 2001; Wong & Cheung 2001). A reduction of TPC has also been reported in higher plant or seaweed samples submitted to oven-drying (Jiménez-Escrig *et al.* 2001; Wong & Cheung 2001; Lim & Murtijaya 2007). Generally, phenolic compounds are known to be rapidly degraded by drying of samples at temperatures above 40°C (Ragan & Glombitza 1986; Wong & Cheung 2001; Toor & Savage 2006; Lim & Murtijaya 2007). However, Larrauri *et al.* (1997) showed that the polyphenols of their samples (Grape

Pomace Peels) were not significantly affected when dried at 60°C. According to Maillard & Berset (1995), three mechanisms are liable to explain the decrease in phenolic contents of samples dried at high temperature: (i) a release of some phenolic compounds bound to cell walls (Schoenwaelder & Clayton 1998) due to breaking of linkages; (ii) a partial degradation of cell wall polymers due to changes in patterns of substitution on the aromatic nucleus of phenolic compounds and/or in the oxidation level in side-chains and (iii) a thermal degradation of polyphenols by oxidative enzymes, e.g. polyphenoloxidases and peroxidases. It is worth noting that these enzymes are not immediately deactivated by sun drying as shown in *Phyllanthus amarus* (Lim & Murtijaya 2007).

The possible and fast degradation of certain phenolic compounds by direct sunlight (Mueller-Harvey 2001; Lim & Murtijaya 2007), may also explain the significant decline in TPC of GD extracts observed here and extraction under natural light. As mentioned before, in *B. bifurcata* samples the extraction procedure in the dark against under light led to higher TPC values and anti-radical activities. This procedure had already been recommended by Ragan & Glombitza (1986).

Thermosensible products are known to be preserved in the course of FD; moreover, further to the elimination of water, degradation of molecules liable to take place in the liquid state does not occur. On the other hand, the destabilization of the native conformation of the molecules induced by FD may lead to a decrease of bioactivities (Franks 1998). Though it is usually recommended to extract phenolics from fresh samples, whenever this advice is not applicable, according to Mueller-Harvey (2001). The best option remains extraction from frozen and/or freeze-dried samples as found in this study. Several reports have emphasized the role of phenolics as antioxidant in seaweeds (e.g. Rice-Evans *et al.* 1997; Jiménez-Escrig *et al.* 2001; Santoso *et al.* 2004; Nakai *et al.* 2006; Kuda *et al.* 2007). A comparison of the ability of the DPPH test and β -carotene bleaching method in the assessment of antioxidant activity (Koleva *et al.* 2002) highlighted the simplicity, speed and substrate hydro/lipophilicity-independent character of the DPPH test. On the other hand, the β -carotene bleaching method proved to be hampered by complex interfacial phenomena resulting from interactions (synergistic, additive or antagonistic effects) between the chemical components of the sample under study and/or the medium phase. This may explain the differences observed in this study between the results of both tests (e.g. antioxidant activity found by DPPH to be significantly higher in *S. muticum* than *B. bifurcata*, but not by the β carotene bleaching method). However, in an assessment by DPPH and β -carotene tests of the antioxidant activity produced by several selected phenolic compounds, Fukumoto & Mazza (2000) found

that the trends exhibited by compounds with similar structures were alike; moreover, the antioxidant activity was enhanced by increasing the number of hydroxyl groups on the aromatic ring. According to Singh & Bharate (2006) the phenolic compounds in *S. muticum* carry more hydroxyl groups than those in *B. bifurcata*, which would explain the significant difference found in this study. Thus, it would be worth conducting further studies devoted to the identification of antiradical and antioxidant compounds in these species to gain more insight into this issue.

The difference observed between species about the effect of OD and GD on TPC may come from differences not only in the structure of phenolic compounds, but also in the morphology of the seaweeds. In *B. bifurcata*, polyphenols could be either less bound to the cell walls or more heat-released than in *S. muticum*. Moreover, the phenoloxidases and peroxidases of *B. bifurcata* could be less active than those of *S. muticum*. Because of its succulent-like morphology, for a given fresh weight, the surface of *B. bifurcata* in contact with the atmosphere (OD treatment) or with UV radiations (GD treatment) is smaller than that of *S. muticum*; the morphology of *B. bifurcata* would thus act as a protective barrier.

This study dealt with the effect of different conditioning treatments on the TPC and antioxidant activities of taxa from the Sargassaceae. Compared with the other treatments, extractions in the dark from fresh material (Fh) resulted in the highest TPCs and antioxidant activities. Among the four conditioning treatments, only Fz and FD caused no significant reduction of TPC and antioxidant activities with respect to Fh extracts. In OD and GD treatments, the heat produced by the oven or UV radiations likely induced some denaturation of phenolic compounds that hampered their bioactivity. Consequently, for Sargassacean species, FD appears as a better drying method than OD or GD. This finding is in agreement with other studies (Franks 1998; Wong & Cheung 2001; Lim & Murtijaya 2007). It emerges from this study that the conditioning treatment to be applied must take into account the species under study as well as the kind of investigations to be carried out on the samples.

ACKNOWLEDGMENTS

This study is part of the Ph.D. thesis work carried out by K. Le Lann within the Laboratory of Ecophysiology and Biotechnology of Halophytes and Marine Algae (LEBHAM EA 3877) set at IUEM (UBO). This research was supported by the Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. The authors sincerely thank M.P. Friocourt for fruitful help in the English writing of this manuscript. This

contribution will be registered as N°1078 within the European Institute for Marine Studies (IUEM Brest, France).

REFERENCES

- Chan, J. C.-C., Cheung, P. C. and Ang, P. O. 1997. Comparative studies on the effect of three drying methods on the nutritional composition of seaweed *Sargassum hemiphyllum* (Turn.) C. Ag. *J. Agric. Food Chem.* **45**: 3056–9.
- Connan, S., Delisle, F., Deslandes, E. and Ar Gall, E. 2006. Intra-thallus phlorotannins content and antioxidant activity in Phaeophyceae of temperate waters. *Bot. Mar.* **49**: 39–46.
- Franks, F. 1998. Freeze-drying of bioproducts: putting principles into practice. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **45**: 221–9.
- Fukumoto, L. R. and Mazza, G. 2000. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* **48**: 3597–604.
- Jiménez-Escrig, A., Jiménez-Jiménez, I. and Pulido, R. 2001. Antioxidant activity of Fresh and processed edible seaweeds. *J. Sci. Food Agric.* **81**: 530–4.
- Kaur, C. and Kapoor, H. C. 2002. Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *Int. J. Food Sci. Tech.* **37**: 153–61.
- Koivikko, R., Loponen, J., Honkanen, T. and Jormalainen, V. 2005. Contents of soluble, cell-wall-bound and exuded phlorotannins in the brown alga *Fucus vesiculosus*, with implications on their ecological functions. *J. Chem. Ecol.* **31**: 195–212.
- Koleva, I. I., Van Beek, T. A. and Linssen, J. P. H. 2002. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochem. Anal.* **13**: 8–17.
- Kuda, T., Kunii, T. and Goto, H. 2007. Varieties of antioxidant and antibacterial properties of *Ecklonia stolonifera* and *Ecklonia kurome* products harvested and processed in the Noto peninsula, Japan. *Food Chem.* **103**: 900–5.
- Kumar Chandini, S., Ganesan, P. and Bhaskar, N. 2008. *In vitro* antioxidant activities of three selected brown seaweeds of India. *Food Chem.* **107**: 707–13.
- Larrauri, J. A., Ruperez, P. and Saura-Calixto, F. 1997. Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. *J. Agric. Food Chem.* **45**: 1390–3.
- Lim, Y. Y. and Murtijaya, J. 2007. Antioxidant properties of *Phyllanthus amarus* extracts as affected by different drying methods. *LWT. Food Sci. Technol.* **40**: 1664–9.
- Maillard, M.-N. and Berset, C. 1995. Evolution of antioxidant activity during kilning: role of insoluble bound phenolic acids of barley and malt. *J. Agric. Food Chem.* **43**: 1789–93.
- Mueller-Harvey, I. 2001. Analysis of hydrolysable tannins. *Anim. Feed. Sci. Tech.* **91**: 3–20.
- Nagai, T. and Yukimoto, T. 2003. Preparation and functional properties of beverages made from sea algae. *Food Chem.* **81**: 327–32.

Conditioning effects on TPC of Fucales

245

- Nakai, M., Kagayama, N., Nakahara, K. and Miki, W. 2006. Phlorotannins as radical scavengers from the extract of *Sargassum ringgoldianum*. *Mar. Biotechnol.* **8**: 409–14.
- Plouguerné, E., Le Lann, K., Connan, S., Jechoux, G., Deslandes, E. and Stiger-Pouvreau, V. 2006. Spatial and seasonal variation in density, reproductive status, length and phenolic content of the invasive brown macroalga *Sargassum muticum* (Tendo) Fensholt along the coast of Western Brittany (France). *Aquat. Bot.* **85**: 337–4.
- Ragan, M. A. and Glombitza, K.-W. 1986. Phlorotannins, brown algal polyphenols. *Prog. Phycol. Res.* **4**: 129–241.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J. and Paganga, G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* **2**: 152–9.
- Sanoner, P., Guyot, S. and Marnet, N. 1999. Polyphenol profiles of French cider apple varieties (*Malus domestica* sp.). *J. Agric. Food Chem.* **47**: 4847–53.
- Santoso, J., Yoshie-Stark, Y. and Suzuki, T. 2004. Antioxidant activity of methanol extracts from Indonesian seaweeds in an oil emulsion model. *Fish. Sci.* **70**: 183–8.
- Schoenwaelder, M. E. A. and Clayton, M. N. 1998. Secretion of phenolic substances into the zygote wall and cell plate in embryos of *Hormasira* and *Acrocarpia* (Fucales, Phaeophyceae). *J. Phycol.* **34**: 969–80.
- Singh, I. P. and Bharate, S. B. 2006. Phloroglucinol compounds of natural origin. *Nat. Prod. Rep.* **23**: 558–91.
- Toor, R. K. and Savage, G. P. 2006. Effect of semi-drying on the antioxidant components of tomatoes. *Food Chem.* **94**: 90–7.
- Toth, G. B. and Pavia, H. 2001. Removal of dissolved brown algal phlorotannins using insoluble polyvinylpyrrolidone (PVPP). *J. Chem. Ecol.* **27**: 1899–910.
- Turkmen, N., Velioglu, Y. S. and Sari, F. 2007. Effect of extraction conditions on measured total polyphenol contents and antioxidant and antibacterial activities of Black Tea. *Molecules* **12**: 484–96.
- Wong, K. and Cheung, P. C. 2001. Influence of drying treatment on three *Sargassum* species 2. Protein extractability, *in vivo* protein digestibility and amino acid profile of protein concentrates. *J. Appl. Phycol.* **13**: 51–8.

2.2. Suivi écologique et écologie chimique de Sargassaceae tempérées

2.2.1. Suivi spatio-temporel des populations

Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'une publication soumise à **Marine Biology**. La référence de cet article, présenté p.109, est :

Le Lann K. & V. Stiger-Pouvreau (*in review*) Comparison of spatio-temporal phenologies of introduced and native Sargassaceae species living in coexistence along the coast of Western Brittany, Marine Biology, **MABI-D-09-00463**

Afin de comparer la phénologie spatio-temporelle de l'espèce introduite *Sargassum muticum* et celles de deux espèces natives *Bifurcaria bifurcata* et *Cystoseira baccata*, les caractères biologiques et chimiques de ces macroalgues ont été suivis mensuellement sur deux différents sites de la Pointe Bretagne : la Pointe du Diable et Porsmeur. Cette étude a montré que la densité de *S. muticum* était dépendante du site, contrairement aux densités des deux espèces indigènes et que la saison influençait la taille de *S. muticum* et *C. baccata*. De plus, une augmentation des teneurs en composés phénoliques a été notée en été et juste avant la période de reproduction de chaque espèce. D'ailleurs, chez les trois espèces étudiées, les teneurs en composés phénoliques étaient significativement corrélées à l'activité antiradicalaire. Cette étude a aussi montré que *S. muticum* présentait une plasticité phénologique non observée chez les deux espèces natives et que cette espèce introduite semblait dorénavant en équilibre avec les deux espèces de Sargassaceae étudiées.

Comparison of spatio-temporal phenologies of introduced and native Sargassaceae species living in coexistence along the coast of Western Brittany

Klervi Le Lann ¹ and Valérie Stiger-Pouvreau ¹

¹ LEBHAM EA 3877, European Institute for Marines Sciences, University of Western Brittany, European University of Brittany (Université Européenne de Bretagne), Technopôle Brest-Iroise, 29280 Plouzané, FRANCE.

Corresponding author: klervi.lelann@gmail.com , Tel: +33 (0)2 98 49 86 68 , Fax : +33 (0)2 98 49 87 72

Abstract

In order to compare the spatio-temporal phenology of the introduced species *Sargassum muticum* against those of *Bifurcaria bifurcata* and *Cystoseira baccata*, biological and chemical characteristics of these seaweeds were monthly monitored in two different sites set along the coast of Western Brittany. The study showed a site-dependence of the density and length in *S. muticum* contrarily to the two native species. Season had an influence on the length in *S. muticum* and *C. baccata*. An elevation of phenolic contents was noticed in summer and just before the reproductive period in each species. Moreover, in every species, the phenolic contents were significantly correlated with the antiradical activity. *S. muticum* presented a phenological plasticity, unobserved in the two native species. More generally, the study showed that, though the three species live in the same habitat, they share now separate ecological niches. Finally, *S. muticum* seems to be now in equilibrium with the native species.

Keywords: Sargassaceae, Introduced vs native species, Population biology, spatio-temporal variations, phenolic content, antioxidant activities, DPPH, Beta-carotene, *Sargassum muticum*, *Cystoseira baccata*, *Bifurcaria bifurcata*.

Abbreviations: BCBM: β -carotene bleaching method, DPPH: 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DW: dry weight, PD: Pointe du Diable, PM: Porsmeur, TPC: total phenolic content

Introduction

It has been established (Levin *et al.* 2002) that the number of species anthropogenically introduced is rapidly increasing, especially in marine environments because of the intensification of international shipping, aquaculture, aquarium activity (Boudouresque et Verlaque 2002) and yachting (Mineur *et al.* 2008). With a record of 277 introduced species all over the world, marine macroalgae account for a significant part of the marine invasive organisms, and their impact on the environment has attracted the attention of the scientific community (See Williams et Smith 2007 for a review). Among these introduced seaweeds, *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt, a brown algae from Japan is widespread along the European shoreline, from Portugal to Norway, including the Mediterranean Sea (Olabarria *et al.* 2009, Mineur, unpublished data). The first observation of *S. muticum* in Europe was reported in 1973 on the Isle of Wight (Farnham *et al.* 1973). In 1980, *S. muticum* was observed in France, at Brest and Port Blanc, and then at Roscoff in 1981 (Cabioch 1981). Numerous studies carried out soon after its introduction along the coasts of United Kingdom have highlighted its adaptability and invasive character (see Critchley *et al.* 1990 for a review). Its establishment in intertidal pools and subtidal habitats has been followed through regression of native species and

subsequent changes in community structure (e.g. Stæhr *et al.* 2000, Britton-Simmons 2004). For example, the expansion of *S. muticum* in Denmark (Stæhr *et al.* 2000) and in Portugal (Arenas *et al.* 2003, Engelen *et al.* 2003) has induced a decrease of the native perennial algae, *Halydris siliquosa*, a close relative of *S. muticum* (Rousseau *et al.* 1997). Even if this introduced seaweed is known to impact indigenous species, to our knowledge no study has dealt with the coexistence of native Sargassaceae with the well-established *S. muticum*.

Alike other seaweeds, Sargassaceae species can accumulate secondary metabolites in large amounts (Hay 1996), and among them, phenolic compounds are known to be the most numerous in temperate brown algae (Steinberg 1992). Polyphenolic compounds have various putative roles (see Amsler *et al.* 2006 for a review) including defence against attackers like grazers (e.g. Lüder *et al.* 2004, Stiger *et al.* 2004, Hemmi *et al.* 2005, Fairhead *et al.* 2006, Svensson *et al.* 2007) or epiphytes (e.g. Brock *et al.* 2001, Wikström *et al.* 2004, Brock *et al.* 2007) and protection from UV radiation (e.g. Swanson *et al.* 2002, Henry *et al.* 2004, Bjerke *et al.* 2005, Fairhead *et al.* 2006). Their contents in Phaeophyceae are ruled by various environmental factors such as season (Plouguerné *et al.* 2006), light (Abdala-Díaz *et al.* 2006) and nutrient concentration (Yates *et al.* 1993). Moreover, phenolic compounds are known to display some antioxidant activities (Rice-Evans *et al.* 1997, Le Lann *et al.* 2008).

This study was aimed at comparing the spatio-temporal patterns of the biological and chemical characteristics exhibited by *S. muticum* and two native Sargassaceae species: *Bifurcaria bifurcata* R. Ross and *Cystoseira baccata* (S.G. Gmelin) P.C. Silva. Phylogenetically, *B. bifurcata* and *C. baccata* are relative to *S. muticum* (Rousseau *et al.* 1999). Little is known about the phenologies of these two indigenous brown algae. Indeed, to our knowledge a single study has dealt with seasonal variations in the chemical composition of *B. bifurcata* (Culioli *et al.* 2002) and the investigations by other authors have been aimed at gaining more insight into the impact of natural intertidal cycles on the total phenolic content of three intertidal brown algae (Connan *et al.* 2007). It seems that no study has been devoted to *C. baccata*. These considerations drove us to carry out these investigations in order to compare the phenologies of *S. muticum*, *C. baccata* and *B. bifurcata*: some biological (length, density and maturity) and chemical (phenolic content, antioxidant and antiradical activities) variables assessed through a monthly monitoring from December 2006 to May 2008 in two different field sites selected because of the coexistence of these three species.

Materiel & Method

Environmental conditions, organisms under study and sampling

Thalli of the non-native *Sargassum muticum* and the native *Bifurcaria bifurcata* and *Cystoseira baccata* were collected in two field sites of Brittany: Pointe du Diable (PD) [48°21.255' N, 4°33.510' W] and Porsmeur (PM) [48°28.871' N, 4°46.142' W]. These sites were chosen because of (1) their geographical and hydrodynamic features and (2) the well-established presence of the three species in the same area. Pointe du Diable is sheltered contrary to Porsmeur, hydrodynamic features in each field site were highlighted by the presence or the absence of *Ascophyllum nodosum* (Linnaeus) Le Jolis, which forms a belt at mid-tide level on only sheltered shores (Connan *et al.* 2006). A belt was present at Porsmeur, but not at Pointe du Diable. Moreover, *Gibbula spp.* and *Idotea sp.* were found at the both sites, whereas *Nucella spp.* only occurred at Pointe du Diable and sea hares (*Aplysia sp.*) only lived at Porsmeur. At Pointe du Diable, steep-sided rock pool tide is ≈ 60-cm deep and at Porsmeur tide channel is ≈ 40 cm deep. A schema of both tide pools is presented on Figure 1. The samples were always collected at low tides within randomly positioned 0.25 m² quadrats. The size of the quadrat area had been determined in preliminary studies of the populations settled in each of the field-sites (Plouguerné 2006).

The appropriate number of replicates necessary to significantly represent the population was determined, at the beginning of the study, through use of the Elliott formula (Plante et Le Loeuff 1983) with $p = 15\%$. The ecological variables monthly measured from December 2006 to May 2008 were the density of population, i.e. the total number of individuals in the sampled area (0.25 m^2), the maturity index and size. The maturity index indicates the number of mature individuals in each sample as described in the literature for tropical Sargassaceae (Stiger et Payri 1999ba) and temperate ones (Plouguerné *et al.* 2006). A thallus was considered as mature when it bore receptacles. The maturity index in a quadrat is given by the ratio of the number of mature individuals to the total number of individuals. Following McCourt 1984), the parameter 'length' corresponds to the size of the longest primary lateral. Seawater temperature and salinity were also monthly measured at each site. At the same time and during the same period, *S. muticum*, *B. bifurcata* and *C. baccata* thalli were randomly sampled for further determinations of phenolic content and antioxidant activities. During the reproductive period, mature and non mature thalli were separately collected to investigate whether the phenolic content was affected by maturity. Once back at the laboratory, the algal material was pooled per site, and the basal and the median part were chopped into fragments (Connan *et al.* 2006, Plouguerné *et al.* 2006, Le Lann *et al.* 2008a). The mixed tissues were finally sub-sampled for phenolic extraction and assessment of dry matter percentage. The collected samples were stored at -25°C prior to the extraction process.

Environmental data collection

The data sets about temperature (expressed in $^\circ\text{C}$), salinity (‰), NH_4 , NO_2 , NO_3 and PO_4 concentrations (expressed in $\mu\text{mol/L}$) were obtained by "Service d'Observation en Milieu Littoral, INSU-CNRS, Brest". Concerning light data, monthly light data (PAR) expressed in μM ($\mu\text{einstein/m}^2/\text{s}$) were issued from a LI-COR LI-190SA Quantum Sensor and a LI-1000 datalogger integrator (Marine Chemistry Team, Station Biologique de Roscoff, France).

Phenolic extraction and assay

Extraction of phenolic compounds by methanol/water (50/50, v/v) in mixture was carried out at 40°C for 3 h under rotary agitation (60 rpm). The samples were centrifuged at $6\,500\text{ g}$ (Sigma 3K10, Osterode, Germany) and evaporated at 40°C under vacuum with a Rotavapor system (R-3000, Büchi, Flawil, Switzerland) as described in Le Lann *et al.* (2008). The total phenolic content (TPC) was determined by spectrophotometry (spectrophotometer Shimadzu UV 160A, Croissy, France) with an adapted Folin–Ciocalteu assay (Sanoner *et al.* 1999), known to be less affected by interfering compounds. Interfering substances, however, are thought to account for less than 5% of the Folin–Ciocalteu-reactive compounds in brown seaweeds (Toth et Pavia 2001b). Phloroglucinol (1,3,5-trihydroxybenzene, Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) was used as a standard, and concentrations were determined in each extract by drying 3 aliquots of $500 \mu\text{L}$ at $50\text{--}60^\circ\text{C}$ for 48 h. TPCs are expressed in % phenolic compounds per dry weight (DW).

Antioxidant activity determination by DPPH radical scavenging assay

The antiradical activities in Sargassaceae extracts were determined by the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay modified as described in Connan *et al.* 2006) and Turkmen *et al.* 2007). Butylated hydroxyl-anisole (BHA), butylated hydroxyl-toluene (BHT) (respectively 2(3)-*t*-Butyl-4-hydroxyanisole and 2, 6-Di-*tert*-butyl-4-methylphenol), ascorbic acid (L-ascorbic acid) and α -tocopherol (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) were used as positive controls. Briefly, various dilutions of the extracts were prepared in triplicates before addition of $3.58 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ of DPPH radical ($200 \mu\text{L}$) to $20\text{--}\mu\text{L}$ aliquots of the extracts. The mixture was stored in the dark for 60 min prior to absorbance measurement at 540 nm. Distilled water was used as negative control. All samples were assayed in triplicate. Antioxidant activity was expressed as IC50 (the concentration of substrate that causes a 50% loss of the DPPH activity). A high IC50 is considered as indicative of a weak antioxidant activity and *vice-versa*.

Antioxidant activity determination by β -carotene bleaching method (BCBM)

The antioxidant activity of extract samples and controls was measured by the β -carotene bleaching method (BCBM) modified according to Koleva *et al.* 2002) and Kaur et Kapoor 2002). Briefly, 2 mL of a β -carotene solution in chloroform (0.1mg/mL) were added to round-bottom flasks that already contained 20 mg of linoleic acid and 200 mg of Tween 40. After evaporation with a rotavapor, oxygenated distilled water (50 mL) was added, and the mixture was shaken to form a liposome solution. This mixture was added to 12 μ L of either extracts, or positive controls (BHA, BHT, ascorbic acid and α -tocopherol), or negative ones (distilled water and ethanol). The absorbance of the solution at 450 nm was measured immediately ($t = 0$ min) and after 2 hours at 50°C ($t = 120$ min). All samples were assayed in triplicate. Antioxidant activity was expressed through the antioxidant activity coefficient (AAC) as follows:

$$AAC = [(A_{s(120)} - A_{c(120)}) / (A_{c(0)} - A_{c(120)})] \times 1000$$

where $A_{s(120)}$ is the absorbance of the antioxidant mix at $t = 120$ min, $A_{c(120)}$ is the absorbance of the control at $t = 120$ min, and $A_{c(0)}$ is the absorbance of the control at $t = 0$ min. Since the positive controls, BHA and BHT, had an average AAC of 700, this value was arbitrarily chosen to express the antioxidant activity as IC700 (Le Lann *et al.* 2008a). IC700 represented then the concentration of substrate needed to get an AAC value of 700. Furthermore, the lower IC700 is, the stronger the antioxidant activity is.

Statistics

The software “Statistica 8” for PC was used for all statistical analysis. All laboratory analyses were performed in triplicates, and their results are presented as mean values \pm standard deviation (SD). Homogeneity of variance was tested with the Cochran test at the 0.05 significance level.

Data were arcsine (square-root) transformed when necessary to satisfy the ANOVA requirements. When data showed a significant difference, a Fisher LSD test at $p < 0.05$ was used as a post-hoc test. Moreover, the correlations between TPC and antioxidant capacity (EC50 or IC700) of extracts were tested. In the same way, the correlations between TPC, antioxidant capacity (EC50 or IC700), maturity index, length, density and environmental factors (PAR, temperature, salinity, NH_4 , NO_2 , NO_3 or PO_4 concentrations) were tested by Pearson’s correlation (r value, $p < 0.001$) to determine whether environmental factors were implicated in TPC, antiradical and antioxidant activities and biological variables.

Results

The results of 2-way ANOVA test about density, length, maturity index, TPC, DPPH and BCBM are presented in Table 1, whereas those of the 3-way ANOVA test are given in Table 2.

Density

Whatever the site and season, the density of *Sargassum muticum* populations was significantly higher than those of *Bifurcaria bifurcata* and *Cystoseira baccata*. The latter was significantly the less dense population ($p < 0.001$, Fisher – LSD test, Table 1). The finding of a significant interaction ($p < 0.001$, Table 1) between sites, species and seasons indicates that the differences in density observed over the species depend on the site and season under consideration (Fig. 2A). Concerning *B. bifurcata*, Table 2 shows no significant difference of density between the two sites (3.49 ± 0.75 ind/0.25 m² at Pointe du Diable and 2.40 ± 0.83 ind/0.25 m² at Porsmeur, $p = 0.08$, Fisher – LSD test). On the other hand, the variations with seasons proved to be significant ($p < 0.001$, Table 2, Fig. 2A). One should note that these variations of density with seasons were not alike in both sites ($p < 0.001$, Table 2). Indeed, at Porsmeur, the highest density was recorded in winter (2.82 ± 0.97 ind/0.25 m²) and the lowest one in spring 2007 (2.13 ± 0.22 ind/0.25 m²) whereas at Pointe du Diable, the highest and lowest values were respectively in summer 2007 (5.34 ± 1.50 ind/0.25 m²) and winter 2008 (2.30 ± 0.80 ind/0.25 m²).

The populations of *C. baccata* displayed the same features: i) no significant difference of density between sites ($p = 0.05$, Fisher – LSD test, Table 2) and ii) higher values at Pointe du Diable than at Porsmeur (1.71 ± 0.21 against 1.54 ± 0.25 ind/0.25 m²). As previously, density proved to vary significantly with seasons ($p < 0.001$, Fisher – LSD test, Table 2, Fig. 2A), and the difference of density over seasons was site-dependent ($p < 0.001$, Table 2). The lowest densities were recorded in winters 2007 and 2008 at Porsmeur (1.00 ± 0.00 ind/0.25 m²), but only in winter 2008 at Pointe du Diable (1.07 ± 0.01 ind/0.25 m²). The highest values were measured in springs at Porsmeur (1.20 ± 0.01 ind/0.25 m²) and in summer 2007 at Pointe du Diable (1.50 ± 0.01 ind/0.25 m²).

However, the density of *S. muticum* varied significantly with site and seasons ($p < 0.001$, Table 2, Fig. 2A). The finding of a significant interaction ($p < 0.001$, Table 2) between both factors demonstrates that the difference of density is site- and season-dependent. At Porsmeur, the highest and lowest densities were respectively recorded in spring 2007 (4.71 ± 1.53 ind/0.25 m²) and winter 2008 (2.06 ± 0.16 ind/0.25 m²). At Pointe du Diable, the highest and lowest values were found in autumn 2007 and summer 2007, respectively (30.93 ± 0.58 and 11.39 ± 0.93 ind/0.25 m²). Whatever the season, the density was significantly higher at Pointe du Diable than at Porsmeur (23.48 ± 0.32 ind/0.25 m² and 3.34 ± 0.92 ind/0.25 m², respectively, $p < 0.001$, Fisher – LSD test, Table 2).

Length

The thalli of the 3 species of Sargassaceae showed significant differences of length whatever the site and season ($p < 0.001$, Table 1).

Indeed, *C. baccata* ones were longer than those of *B. bifurcata* and *S. muticum* (Fisher – LSD test, Table 1). The interaction between sites, species and seasons proved to be significant ($p < 0.001$, Table 1), which demonstrates that the differences of length recorded over the species are site- and season-dependent (Fig. 2B).

About *B. bifurcata*, no significant variation with site was observed ($p = 0.93$, Table 2, 25.46 ± 3.02 cm at Pointe du Diable and 30.19 ± 3.25 cm at Porsmeur). On the other hand, the length varied significantly with seasons, but the differences of length noticed over the seasons depended on the site under consideration ($p < 0.001$, Table 2). Indeed, the thalli were the longest in winter 2008 at both Porsmeur and Pointe du Diable (41.00 ± 7.34 cm and 42.27 ± 5.99 cm, respectively). The shortest ones were found in winter 2007 at Porsmeur and in summer 2008 at Pointe du Diable (26.84 ± 2.53 cm and 18.27 ± 3.92 cm, respectively) (Fig. 2B).

C. baccata showed no significant variations of length with space and time ($p = 0.07$, Fisher – LSD test, Table 2). Indeed, the lengths of thalli at Pointe du Diable and at Porsmeur were quite alike (49.51 ± 3.27 against 49.78 ± 3.39 cm). Moreover, the variations of length with seasons were tested not significant ($p = 0.09$, Table 1). Nevertheless, the finding of a significant interaction between sites and seasons ($p < 0.001$, Table 2) indicates that the length is affected by the site and season. At Porsmeur, the thalli were the longest in autumn 2007 (74.78 ± 7.73 cm) and the shortest in summer 2007 (34.50 ± 7.34 cm) whereas at Pointe du Diable, the shortest thalli were found in winter 2007 (41.45 ± 7.34 cm) and the longest ones in summer 2007 (61.88 ± 8.20 cm) (Fig. 2B).

The length of *S. muticum* thallus varied significantly with site and seasons ($p < 0.001$, Table 2, Fig. 2B). The significant interaction ($p < 0.001$, Table 2) between both two factors indicates that the difference in length is dependent on the site and species under consideration. Whatever the season, thalli were significantly longer at Porsmeur than at Pointe du Diable (respectively 58.99 ± 2.49 cm and 22.37 ± 0.87 cm, $p < 0.001$, Fisher – LSD test, Table 2). In both sites, the thalli were the longest in summer 2007 (143.3 ± 5.18 cm at Porsmeur and 45.37 ± 2.42 cm at Pointe du Diable). The shortest thalli were observed in winter 2007 at Porsmeur (17.100 ± 4.74 cm) and in autumn 2007 at Pointe du Diable (9.31 ± 1.50 cm) (Fig. 2B).

It is worth noting that the calculation of the Pearson correlation coefficient evidenced a strong relationship between length and environmental factors only for the alien seaweed. The length of *S. muticum* proved to be positively correlated with PAR ($r = 0,55$, $p = 0.001$) and temperature ($r = 0,60$, $p < 0.001$), but negatively with NO_3^- , NO_2^- and PO_4^- seawater concentrations ($r = -0.51$, $p = 0.001$, $r = -0.39$, $p = 0.018$, $r = -0.46$, $p = 0.005$, respectively) (Table 3).

Maturity

Concerning the maturity index, the interaction between sites, species and seasons was found to be significant ($p < 0.001$). Moreover, it showed variations with species, site and season (Fig. 2C).

The maturity index of *C. baccata* and *B. bifurcata* varied significantly with season ($p < 0.001$ for both species, Table 1), but not with site (respectively $p = 0.13$ and $p = 0.27$, Table 1).

The maturity of *B. bifurcata* showed no significant variation with site ($p = 0.27$, Table 2). This maturity varied significantly with season ($p < 0.001$, Table 2). The lack of significant interaction between both factors ($p = 0.11$, Table 2) indicates that the difference in maturity index noticed over seasons is not related to the site under consideration. In both sites, the maturity index was the highest in autumn (0.93 ± 0.07 at Porsmeur and 1.00 ± 0.00 at Pointe du Diable) and the lowest in summer (0.19 ± 0.07 at Porsmeur and 0.03 ± 0.00 at Pointe du Diable). Figure 2C shows that, like *C. baccata*, *B. bifurcata* may present receptacles all over the year).

The relationship between maturity index and environmental factors proved to be strong (Pearson's correlation, Table 4). Moreover, in *B. bifurcata*, the correlation between the reproduction status and light ($r = -0.61$, $p < 0.001$) and the one with temperature ($r = -0.41$, $p = 0.016$) were both tested as negative, conversely to those with NH_4^+ , NO_2^- and PO_4^- concentrations in seawater ($r = 0.57$, $p < 0.001$, $r = 0.37$, $p = 0.024$ and $r = 0.68$, $p < 0.001$ respectively).

For *C. baccata*, because of the significant interaction ($p < 0.001$, Table 2) found between sites and seasons, the differences of maturity observed over seasons depend on the site under consideration. Nevertheless, in both sites the maximum of maturity was recorded in winter (Porsmeur, 0.90 ± 0.06 and 0.89 ± 0.09 in 2007 and 2008, respectively, Pointe du Diable, 0.75 ± 0.08 and 0.75 ± 0.07 in 2007 and 2008, respectively) and the minimum one in spring 2008 at Pointe du Diable (0.15 ± 0.08) and summer 2007 (0.10 ± 0.03) at Porsmeur. Fertile laterals are present all along the year (Fig. 2C).

As previously observed for *B. bifurcata*, the Pearson correlation showed a strong relationship between maturity index and environmental factors (Table 4) with negative correlations with light ($r = -0.71$, $p < 0.001$) and temperature ($r = -0.44$, $p = 0.008$) and positive ones with NH_4^+ , NO_3^- , NO_2^- and PO_4^- concentrations in the seawater ($r = 0.46$, $p = 0.005$, $r = 0.51$, $p = 0.001$, $r = 0.54$, $p = 0.001$ and $r = 0.63$, $p < 0.001$ respectively).

The maturity index of *S. muticum* was alike at Pointe du Diable and at Porsmeur ($p = 0.13$, Table 2). It varied significantly with seasons ($p < 0.001$, Table 2, Fig. 2C), and the interaction between both factors proved to be significant ($p < 0.001$, Table 2), which means that the differences in maturity index observed over the seasons are site-dependent. Nonetheless, the maturity index was the highest in summer 2007 in both sites (0.7 ± 0.05 at Porsmeur and 0.75 ± 0.03 at Pointe du Diable). Fertile laterals were observed only in summer at Pointe du Diable and in summer as well as autumn at Porsmeur (Fig. 2C).

As previously noticed, Pearson's correlation showed a strong relationship between the maturity index of *S. muticum* and abiotic factors (Table 4). However, the correlation of the reproduction status with light ($r = 0.59$, $p < 0.001$) and the one with temperature ($r = 0.77$, $p = 0.008$) were both positive, whereas those with NO_3^- , NO_2^- and PO_4^- seawater concentrations were all negative ($r = -0.55$, $p < 0.001$, $r = -0.37$, $p = 0.024$, and $r = -0.53$, $p = 0.001$ respectively).

Total Phenolic Content (TPC)

The interaction between TPC and site, season and species was tested as significant ($p < 0.001$, Table 1). Moreover, the differences observed in TPC were site-, season- and species-dependent ($p < 0.001$). Whatever the site and season, TPC displayed significant differences between species with *B. bifurcata* > *C. baccata* > *S. muticum* ($p < 0.001$, Table 1).

Each species displayed significant temporal variations ($p < 0.001$, Table 2, Fig. 3A).

Whatever the season, TPC was significantly higher at Pointe du Diable than at Porsmeur in *S. muticum* population (0.21 ± 0.01 and $0.17 \pm 0.01\%$ DW, respectively, $p < 0.001$, Table 2) conversely to those of *B. bifurcata* (0.34 ± 0.01 and $0.31 \pm 0.01\%$ DW, respectively $p = 0.002$, Table 2) and *C. baccata* (0.29 ± 0.01 and $0.26 \pm 0.01\%$ DW, respectively $p < 0.001$, Table 2). The finding of a significant interaction between site and season for both *C. baccata* and *B. bifurcata* ($p < 0.001$, Table 2) indicates that the temporal variations in TPC are site-dependent, despite the lack of clear seasonal variations (Fig. 3A). At Porsmeur, the highest TPC was recorded in spring 2008 for both *B. bifurcata* ($0.38 \pm 0.02\%$ DW) and *C. baccata* ($0.41 \pm 0.03\%$ DW), the lowest TPC was measured in winter 2007 for the former ($0.22 \pm 0.01\%$ DW) and in spring 2007 for the latter ($0.09 \pm 0.01\%$ DW). At Pointe du Diable, the highest TPC was found in autumn 2007 for *B. bifurcata* ($0.36 \pm 0.02\%$ DW) and in summer 2007 for *C. baccata* ($0.32 \pm 0.01\%$ DW).

In both species the lowest TPC was recorded in spring 2007 (0.20 ± 0.01 and $0.15 \pm 0.02\%$ DW in *B. bifurcata* and *C. baccata*, respectively).

The significant interaction found in *S. muticum* between site and season ($p < 0.001$, Table 2) means that the temporal variations in TPC are site-dependent. The seasonal variations were well marked in both sites with the highest values in summer 2007 (0.25 ± 0.01 and $0.23 \pm 0.02\%$ DW at Porsmeur and Pointe du Diable, respectively) and the lowest ones in autumn 2007 ($0.09 \pm 0.01\%$ DW for Porsmeur and $0.11 \pm 0.01\%$ DW for Pointe du Diable ($p < 0.001$, Table 2 and Fig. 3A). Whatever the season, TPC was higher at Pointe du Diable than at Porsmeur (respectively $0.21 \pm 0.01\%$ DW and $0.17 \pm 0.01\%$ DW, $p < 0.001$, Fisher – LSD test, Table 2).

Significant Pearson's correlations between TPC and environmental factors were found for only *S. muticum* (Table 3) with strong correlations with temperature ($r = 0.40$, $p = 0.016$), NO_3 concentration ($r = -0.45$, $p = 0.006$) and PO_4 concentration ($r = -0.46$, $p = 0.005$).

Antiradical activities (EC50, DPPH)

The antiradical activity of the Sargassaceae under study proved to depend on site, season and species ($p < 0.001$, Table 1 and Fig. 3B). Whatever the seasons and sites, *B. bifurcata* showed the highest antiradical activity (= the lowest EC50 value) and *S. muticum* the lowest one (Fisher – LSD test, Table 1).

The antiradical activity in *B. bifurcata* extracts was significantly affected by site and season ($p < 0.001$, Table 2). Whatever the season, *B. bifurcata* extracts from Porsmeur showed higher antiradical activities than those from Pointe du Diable ($p < 0.001$, Fisher-LSD test, Table 2) whereas those from *C. baccata* and *S. muticum* from Pointe du Diable exhibited higher antiradical activities than those from Porsmeur (respectively $p = 0.004$ and $p < 0.001$, Fisher-LSD test, Table 2).

Figure 3B shows that, at Porsmeur, the lowest EC50 values of *B. bifurcata* extracts were measured in summer 2007 ($\text{EC}_{50} = 0.21 \pm 0.01$ mg/mL) and the highest ones in autumn 2007 ($\text{EC}_{50} = 0.34 \pm 0.01$ mg/mL). The antiradical activity by *C. baccata* extracts was the most elevated in spring 2008 ($\text{EC}_{50} = 0.22 \pm 0.01$ mg/mL) and the lowest in spring 2007 ($\text{EC}_{50} = 0.67 \pm 0.04$ mg/mL). Concerning *S. muticum* extracts, the lowest and the highest EC50 values (0.19 ± 0.03 and 0.74 ± 0.06 mg/mL) were respectively recorded in summer 2007 and winter 2008.

At Pointe du Diable, the extracts from *B. bifurcata* displayed the highest antiradical activity ($EC_{50} = 0.24 \pm 0.01$ mg/mL) in winter 2007 and the lowest one ($EC_{50} = 0.34 \pm 0.01$ mg/mL) in autumn 2007 as observed at Porsmeur. Those from *C. baccata* showed them in spring 2008 ($EC_{50} = 0.22 \pm 0.01$ mg/mL) as observed at Porsmeur and in winter 2007 ($EC_{50} = 0.57 \pm 0.07$ mg/mL). Concerning *S. muticum* extracts, the antiradical activity was the most elevated in summer 2007 ($EC_{50} = 0.11 \pm 0.01$ mg/mL) and the weakest in spring 2008 ($EC_{50} = 0.57 \pm 0.06$ mg/mL) (Fig. 3B). At Pointe du Diable, the highest antiradical activity activities in extracts were observed in winter 2007 for *B. bifurcata* ($EC_{50} = 0.24 \pm 0.01$ and mg/mL), spring 2008 for *C. baccata* ($EC_{50} = 0.22 \pm 0.01$ mg/mL) and summer 2007 for *S. muticum* ($EC_{50} = 0.11 \pm 0.01$ mg/mL)

Pearson's correlation showed a strong relationship between the TPCs and antiradical activities of the Sargassaceae extracts under study ($r = -0.36$, $p = 0.032$, $r = -0.68$, $p < 0.001$, $r = -0.58$, $p = 0.01$ for *B. bifurcata*, *C. baccata* and *S. muticum*, respectively Fig. 4).

A significant Pearson correlation between EC_{50} and environmental factors was found in only the alien *S. muticum* (Table 3). Significant relationships were recorded for PAR ($r = -0.33$, $p = 0.045$), temperature ($r = -0.54$, $p = 0.001$), NO_3^- and PO_4^- concentrations ($r = 0.48$, $p = 0.003$ and $r = 0.43$, $p = 0.09$, respectively).

Antioxidant activity (EC_{700} , BCBM)

The antioxidant activity of the Sargassaceae under study proved to be site- and species-dependent ($p < 0.001$, Table 1, Fig. 3C). Whatever the season and site, *B. bifurcata* exhibited the highest EC_{700} values (= the lowest antioxidant activities) and *C. baccata* the lowest ones (Fisher - LSD test, Table 1).

The antioxidant activity in extracts from *B. bifurcata*, *C. baccata* and *S. muticum* was significantly affected by the site and season ($p < 0.001$ for each species, Table 2). Whatever the season, *B. bifurcata* and *C. baccata* extracts from Porsmeur showed higher antiradical activities than those from Pointe du Diable with $EC_{700} = 0.32 \pm 0.01$ mg/mL and $EC_{700} = 0.35 \pm 0.02$ mg/mL ($p = 0.007$, Fisher-LSD test, Table 2) for *B. bifurcata*, and $EC_{700} = 0.14 \pm 0.01$ mg/mL and $EC_{700} = 0.18 \pm 0.01$ mg/mL ($p < 0.001$, Fisher-LSD test, Table 2) for *C. baccata*. On the other hand, *S. muticum* extracts displayed no significant differences between the two field sites with $EC_{700} = 0.24 \pm 0.01$ mg/mL at Porsmeur and $EC_{700} = 0.26 \pm 0.01$ at Pointe du Diable ($p = 0.08$, Table 2).

Figure 3C shows that, at both sites, the EC_{700} values displayed by *B. bifurcata* extracts are the lowest in spring 2007 (0.25 ± 0.01 and 0.09 ± 0.00 mg/mL, respectively) and the highest in autumn 2007 (0.40 ± 0.01 and 0.46 ± 0.01 mg/mL, respectively). The highest antioxidant activity by *C. baccata* is observed in spring 2007 (0.09 ± 0.00 and 0.06 ± 0.00 mg/mL, respectively) and the lowest one in spring 2008 (0.19 ± 0.00 and 0.36 ± 0.02 mg/mL, respectively). In the case of *S. muticum*, once again spring 2007 corresponds to the highest EC_{700} value (0.32 ± 0.02 and 0.26 ± 0.02 mg/mL, respectively). It is worth noting that the lowest EC_{700} is recorded in winter 2007 at Porsmeur (0.17 ± 0.01 mg/mL), but far much later (autumn 2007) at Pointe du Diable (0.23 ± 0.01 mg/mL).

Concerning the Sargassaceae extracts under study, Pearson's correlation showed no significant relation between TPC and antioxidant activities ($r = 0.16$, $p = 0.33$, $r = 0.35$, $p = 0.063$, $r = 0.14$, $p = 0.36$ respectively for native and the alien species).

Table 5 sums up the main differences found in this study between the three species, i.e. the two natives and the alien one, and in taking into account the hydrodynamism of the two field sites. One should note differences in phenology between the native and the alien species.

Environmental parameters

As expected in this area of Western Europe, the seawater temperature underwent seasonal variations ($p < 0.001$, Figure 5A): the coolest temperatures were, indeed, recorded in winter (10.79 ± 0.32 °C in February 2007 and 9.67 ± 0.23 °C in February 2008) and the warmest ones in summer (17.05 ± 0.25 °C in August 2007).

Salinity proved to significantly vary with seasons ($p < 0.001$, Figure 5A). The highest and the lowest values were measured, respectively, in autumn (35.29 ± 0.12 , November 2007) and spring (33.87 ± 0.12 , March 2008).

As expected, light intensity also varied with season ($p < 0.001$, Figure 5B): indeed, the lowest PAR value was recorded in December 2008 (108.35 ± 3.35 µM) and the highest one in August 2007 (705.56 ± 13.72 µM).

Concerning the seawater NH_4^- , NO_2^- and NO_3^- -levels, all of them exhibited seasonal variations ($p < 0.001$, Figure 2C) with the lowest concentrations in August 2007 ($\text{NH}_4 = 0.25 \pm 0.11$ µM, $\text{NO}_3 = 0.78 \pm 0.15$ µM and $\text{NO}_2 = 0.045 \pm 0.005$ µM) and the highest ones at different times of winter according to the variables ($\text{NH}_4 = 1.44 \pm 0.11$ µM in December 2007, $\text{NO}_3 = 23.73 \pm 1.52$ µM in January 2007 and $\text{NO}_2 = 0.99 \pm 0.058$ µM in December 2006).

Figure 5D about PO_4 concentrations clearly shows seasonal variations ($p < 0.001$) with the recording of the highest and lowest levels (0.55 ± 0.006 and 0.032 ± 0.006 µM) in February and August 2008, respectively.

Discussion

The investigations reported here highlighted differences in the phenologies of the three species of Sargassaceae under study, which are known to co-exist in the same habitat i.e. the introduced *Sargassum muticum* and the two native species, *Cystoseira baccata* and *Bifurcaria bifurcata*. Concerning these species, only *S. muticum* has been the subject of ecological studies: indeed, in two of them, this Japanese species was compared with a native Sargassaceae species, i.e. *Cystoseira nodicaulis* (Whit.) (Arenas *et al.* 1995) and *Halidrys siliquosa* (L.) Lyngb. (Wernberg *et al.* 2001). The experimental results obtained in this study about *S. muticum* are in agreement with literature data about the population biology of this invasive species (Critchley *et al.* 1990, Plouguerné *et al.* 2006).

Density

The finding of significant spatial variations in the density of *S. muticum* populations is indicative of the impact by the type of substratum and hydrodynamism. As expected from an earlier study (Plouguerné *et al.* 2006), the density of this introduced seaweed proved to be higher at Pointe du Diable, a rocky and exposed site, than at Porsmeur, a sheltered area with a sandy substrate. This suggests an acclimation of *S. muticum* to both water movement and to the type of substratum (Stæhr *et al.* 2000, Plouguerné *et al.* 2006). The finding of a positive correlation between *S. muticum* distribution and boulders was reported by Thomsen *et al.* (2006), who also explained the negative correlation found with stones by the potential loss of large individuals in spring and summer. Indeed, as these individuals present pull-, lift- and buoyancy-forces, they could be washed away by currents and waves (Kendrick et Brearley 1997).

One should note that this mode of transport has been suggested as a dispersal mechanism for *S. muticum* (Stæhr *et al.* 2000, Wernberg *et al.* 2001) as already highlighted for tropical Sargassaceae (Stiger and Payri 1999b). The spatial variations of density could also result from the impact by environmental conditions on the settlement of germlings (Engelen *et al.* 2008, Monteiro *et al.* 2009). According to Monteiro *et al.* (2009), settlement density would be

more elevated in tidal pools than in tidal channels: Porsmeur field site is a tidal pool flushed by a stream and with a sandy substratum. It is worth wondering whether the survival of germlings of Sargassaceae species could be at risk by a mechanical impact of sand.

The lack of spatial variations of density for the two native species (*B. bifurcata* and *C. baccata*) seems in agreement with the report by Viejo (1997) of no significant spatial variation of the cover percentage of *C. baccata* and *B. bifurcata* in Spain. Unfortunately, the paper gives no information about the hydrodynamism of the field site.

The temporal variations of density values observed here for the three species are consistent with the available descriptions of seasonality in biological characteristics in other temperate regions (McCourt 1984, Plouguerné *et al.* 2006, Thomsen *et al.* 2006). The density of Sargassaceae populations is known to be affected by seasonal changes in water movements (Plouguerné *et al.* 2006). High recruitment events in autumn and the fast growth of plantlets from spring to summer could explain the significant variations of *S. muticum*, density over short periods (see below and Thomsen *et al.* 2006).

Length

Like density, the length of the alien *S. muticum* individuals proved to depend on both the type of substratum and the hydrodynamism. Indeed, the thalli were always shorter in the rocky and exposed field site (Pointe du Diable) than in the sheltered and sandy one (Porsmeur), the difference was especially marked in summer with the recording of thalli three times longer at Porsmeur than at Pointe du Diable. These observations contradict those reported by Plouguerné *et al.* (2006) and Engelen *et al.* (2005), who found longer lengths in exposed field sites than in sheltered ones. It is worth wondering about this discrepancy: it cannot be attributed to a negative impact of low salinity on the growth of *S. muticum* (Stæhr *et al.* 2000, Plouguerné *et al.* 2006) since no relationship between parameters was found in this study. The observation of hydrodynamism at both sites drove us to follow proposals by Gaylord *et al.* (1994) and Viejo *et al.* (1995) and assume that the seaweeds living at Pointe du Diable could break off when they reach a critical size. Indeed, at Pointe du Diable, *S. muticum* individuals were bushier and showed more damaged laterals than at Porsmeur (Le Lann, personal data), maybe because of the breakage of the primary apex. This damage could result in an enhancement of secondary lateral growth (Chamberlain *et al.* 1979).

In both field-sites, the populations of *S. muticum* showed a life-cycle with a period of growth marked by an increase of length (spring-summer) followed with a period of senescence in autumn as previously described by Plouguerné *et al.* 2006). This seasonal growth was controlled by environmental conditions as highlighted by the relationships found here between length and light conditions (PAR), temperature, NO_3^- , NO_2^- and PO_4^- -concentrations. Light conditions and temperature are known to act as growth regulators in *S. muticum* (Arenas *et al.* 1995, Plouguerné *et al.* 2006) and nutrients (NO_3^- , NO_2^- , NH_4^+ and PO_4^-) as growth booster (Sanchez et Fernandez 2006).

As previously described for *Cystoseira nodicaulis* (Arenas *et al.* 1995), in both sites, the growth period of *C. baccata* was equivalent to the development of new branches in thallus apex (Le Lann, personal data). Moreover, the lengths were quite alike. However, a time shift was noticed in the seasonal variations displayed by these algal populations: indeed, at Pointe du Diable, the growth period extended from winter 2007 to summer 2007 and was followed with a decrease of length from autumn 2007 to spring 2008, whereas at Porsmeur, the growth period was delayed to late summer 2007 and mainly autumn.

Because of the lack of relationship between length and environmental parameters (light condition, temperature or nutrient levels), this time shift could be explained by the differences of substratum or/and hydrodynamism between the two field-sites.

The length of *B. bifurcata* showed no significant variation with site. However at Pointe du Diable, the growth was enhanced from summer to autumn, and the algae proved to be longer in winter and spring 2007 than in 2008. At Porsmeur, no seasonal variation was recorded. No relationships were found between the length and either light conditions, or temperature or nutrient levels. It would be worth conducting a longer monitoring to gain more insight into the evolution over time of *B. bifurcata* length.

According to Viejo *et al.* (1995), the observation of lower rates of elongation by *S. muticum* settled at exposed sites compared to those growing in sheltered areas could reflect some phenotypic flexibility to the environment. Because of the significant spatial variation of length in *S. muticum*, this introduced alga could then present a phenotypic plasticity conversely to the native species, *B. bifurcata* and *C. baccata*.

Maturity

The three species under study exhibited different reproductive patterns. Populations of the introduced *S. muticum* showed a reproductive phenology in agreement with literature data (Critchley *et al.* 1990 for a review before 1990, Arenas *et al.* 1995, Plouguerné *et al.* 2006) with maturity only from late spring to early autumn. The decrease of maturity rate corresponded to the period of senescence marked by the loss of laterals. One should however note that, at Porsmeur, the reproductive period was slightly longer than at Pointe du Diable and extended to autumn. This small difference may be explained by the hydrodynamism.

On the other hand, the populations of *C. baccata* and *B. bifurcata* demonstrated their ability to reproduce all over the year, except in the period of dormancy, i.e. from spring to summer for *C. baccata* and in summer for *B. bifurcata*. Little is known about the reproductive phenology of native Sargassaceae: *Cystoseira nodicaulis* from North Spain showed a non-reproductive period from late summer to early autumn (Arenas *et al.* 1995), whereas the maturity period of *Halydris siliquosa* from Denmark was in winter. The reproductive period of *B. bifurcata* in this study was similar to the one observed in Ireland (Hardy et Moss 1979).

The finding, here, of strong relationships between maturity index and light, temperature, NO_3^- , NO_2^- or PO_4^- concentrations is consistent with the investigations by Plouguerné *et al.* (2006), which showed an impact of seawater temperature on *S. muticum* reproduction as well as a strong relationship between maturity and light for *S. muticum* from Pointe du Diable. The role of nutrient in reproduction is still unclear (Lobban et Harrison 1994). Nevertheless, the increase of nutrient levels after the summer period could lead to an elevation of maturity rate in the two native species. The decrease of maturity index values in *S. muticum* could result from the senescence of thalli instead of an increase of nutrient concentrations.

TPC and antioxidant capacity

All of the three species under study showed a seasonal pattern for TPC with the highest levels usually in summer. This finding is in agreement with previous descriptions of maxima in spring or summer (Connan *et al.* 2004, Abdala-Díaz *et al.* 2006, Plouguerné *et al.* 2006). However, other authors have reported on maximum levels for Fucales in winter (Ragan et Jensen 1978) or from late summer to mid-winter depending on the species (Ragan et Glombitza 1986).

The increase of TPC in spring is in favor of the implication of phenolic compounds in the photo-protection of Sargassaceae species. Such a role has been already reported in the literature. Indeed, individuals of *Ascophyllum nodosum* are known to respond to an addition of UV-B radiations by an increase in TPC (Pavia *et al.* 1997). An elevation of phlorotannin levels was observed in *Fucus gardneri* submitted to an in-lab UV-B exposure (Henry et Van Alstyne 2004). Moreover, an increase of PAR resulted in a higher TPC in *Desmarestia* species (Fairhead *et al.* 2006), in *Cystoseira baccata* (Abdala-Díaz *et al.* 2006) and in *S. muticum* (Plouguerné *et al.* 2006). In this study, no significant relationship was been found between TPC and PAR. Contrary to the two native species, in *S. muticum* the TPC proved to be correlated positively with temperature, and negatively with NO_3^- and PO_4 -concentrations.

Evidence of the impact of temperature on TPC variability in *S. muticum* population at the exposed site Fort Bloqué (Brittany) was provided by Plouguerné *et al.* (2006).

The decrease of TPC observed, here, in *S. muticum* populations can be caused by a rise of nutrient levels in the environment: this hypothesis is supported by the reports of similar effects in *Fucus vesiculosus* (Peckol *et al.* 1996, Pavia et Toth 2000b, Jormalainen *et al.* 2003, Hemmi *et al.* 2004, Koivikko *et al.* 2008) and *Ascophyllum nodosum* (Svensson *et al.* 2007). One should, however, note that this not the case in every study about brown seaweeds (Cronin et Hay 1996b, Pavia et Toth 2000b). Nevertheless, the negative influence of nutrient enrichment on the total phlorotannin contents is predicted by both the carbon-nutrient balance (CNB) and the growth-differentiation balance (GDB) hypotheses (Koivikko *et al.* 2008).

It is worth noting the correspondence between the second elevation of polyphenolic compounds level observed in *C. baccata* from both sites and *B. bifurcata* from Pointe du Diable and the increase of maturity index. Similarly, the rise of TPC in *S. muticum* in summer also corresponds to the reproduction period of this alga. According to Steinberg (1984), in the kelp, *Alaria marginata*, the investment to chemical defence by reproductive tissue is greater. In mature adults, an elevation of phenolic levels may constitute a way to protect receptacles against herbivory during zygote incubation. Polyphenolic compounds are, indeed, known to have a repellent action against grazers (see Amsler et Fairhead 2006 for a review).

The results produced, here, by DPPH assay and BCBM were not alike. It is worth wondering whether they can be explained by the intrinsic properties of each test. Indeed, a comparison of the respective abilities of the DPPH test and BCBM in the assessment of antioxidant activity highlighted the simplicity, speed and substrate hydro/lipophilicity-independent character of the DPPH test, on the other hand, BCBM proved to be hampered by complex interfacial phenomena issued from interactions, through synergistic, additive or antagonistic effects, between the chemical components of the sample under study and/or the medium phase (Koleva *et al.* 2002). The types of antioxidants assayed by the two methods are likely different: DPPH gives insight into the levels of the lipophilic and hydrophilic compounds, whereas BCBM assesses the levels of only the lipophilic compounds (Chew *et al.* 2008). The antioxidant activity (EC700) of hydro-methanol seaweed extract could deal with other secondary metabolites such as galactolipids (Deal *et al.* 2003), pigments (Le Tutour *et al.* 1998), meroditerpenoids (Jang *et al.* 2005), plastoquinones (Iwashima *et al.* 2005a), or aromatic compounds (Seo *et al.* 2004). This could explain the lack of correlation between the antioxidant activities of extracts and TPC. The finding of higher antioxidant activities in *B. bifurcata* and *C. baccata* extracts at Porsmeur than at Pointe du Diable, despite the lack of relationship between

antioxidant activity and environmental parameters (light, T, nutrient concentrations) suggests a possible impact by hydrodynamism and/or substratum on the production of antioxidant compounds in both native algae. But, the introduced species, *S. muticum* exhibited no spatial variation in antioxidant activity.

In other respect, the three species exhibited temporal variations of their antioxidant activities, however, neither cycle nor seasonal variations were evidenced.

The strong relationship observed between the radical-scavenging activity and TPC is in agreement with previous studies (Jimenez-Escrig *et al.* 2001, Connan *et al.* 2007, Devi *et al.* 2008, Le Lann *et al.* 2008a). Similar findings have already been reported about *S. muticum* (Connan *et al.* 2006, Le Lann *et al.* 2008a) and for *B. bifurcata* (Connan *et al.* 2007, Le Lann *et al.* 2008a), on the other hand, to our knowledge, this study provides the first evidence of such a correlation in *C. baccata*. The relationship between TPC and EC50 could come from the fact that both Folin-Ciocalteu assay and DPPH test are based on redox balances in phenols (Huang *et al.* 2005).

However, Connan *et al.* (2007) mentioned the putative implication of phlorotannin structures, especially their polymerization degree, in the antiradical activity, given that small phenolic compounds are generally less active than highly polymerized ones (Nakamura *et al.* 1996). Moreover, because of their reducing properties as hydrogen or electron-donating agents, phenolic compounds are expected to act as antioxidant (Rice-Evans *et al.* 1997). Consequently, the antiradical activity, measured by the DPPH assay, may constitute a qualitative approach of the TPC. Indeed, among the three species under study, *S. muticum* displayed both the highest radical-scavenging activity and the lowest TPC. This finding suggests that the polyphenolic compounds produced by the introduced seaweed could be more active than those produced by the native species, especially in summer.

Conclusion

The introduction of *Sargassum muticum* in Brittany coasts had probably initially disturbed native species by preying on them or out-competing them for space, nutrient and light. Nevertheless, the ability to reproduce nearly all over the year displayed by the two native species, *C. baccata* and *B. bifurcata*, as well as the extension of their maximal reproductive period over one or two seasons are contrasting with the reduced ability of *S. muticum* restricted to only summer. In their reproductive period, all of the three Sargassaceae species produced phenolic compounds as a defence mechanism of mature laterals against grazers or other attackers. On the other hand, the three species under study produced phlorotannins in summer which could act as a protection against UV. So, the introduced and the native species showed different strategies. The alien seaweed is a seasonal species whereas the both indigenous algae are aseasonal species. Moreover, *S. muticum* exhibited a phenotypic plasticity conversely to the native species. Despite the invasive character of *S. muticum*, especially in summer, the native Sargassaceae are both able to persist and cohabit with *S. muticum* in the same area. It is apparent that in Brittany coasts *S. muticum* have found its ecological niche and that the three species live now in equilibrium.

Acknowledgment

This study is part of the first author's Ph.D. project carried out at IUEM (UBO) within the Laboratory of Ecophysiology and Biotechnology of Halophytes and Marine algae (LEBHAM EA 3877) under the supervision of the second author. This research was supported by the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. The authors sincerely thank M.P. Friocourt for assistance in English writing. Additional thanks are addressed to Xavier Bodériou,

Fabrice Collon, Camille Jegou, Christiane Julou, Laetitia Meot-Duros, and Marie-Aude Poullaouec, for efficient assistance on the field. Light data were kindly given by Thierry Cariou from the Marine chemistry Team from the Marine Station of Roscoff (France).

References : voir la partie Bibliographie p. 301.

List of Figures legends

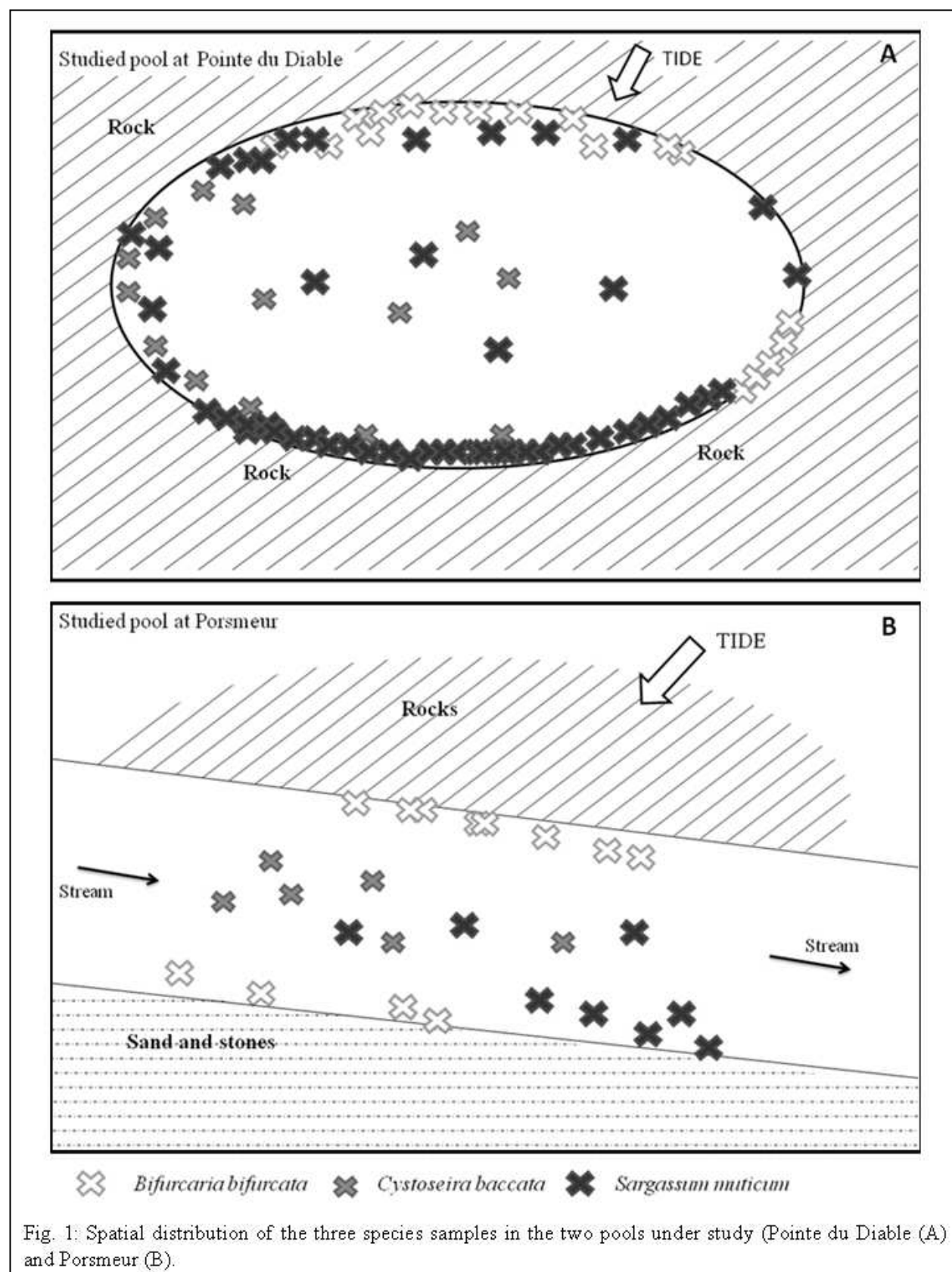
Fig. 1: Spatial distribution of the three species samples in the two pools under study (Pointe du Diable (A) and Porsmeur (B)).

Fig. 2: Seasonal variations in density (A), length (B) and maturity index (C) displayed by *Bifurcaria bifurcata*, *Cystoseira baccata* and *Sargassum muticum* at Pointe du Diable and Porsmeur. W07: Winter 2007. Sp 07: Spring 2007. Su 07: Summer 2007. A 07: Autumn 2007. W 08: Winter 2008. Sp 08: Spring 2008.

Fig. 3: Seasonal variations in Total Phenolic Content (TPC) (A), antiradical activity (EC50) (B) and antioxidant activity (EC700) (C) displayed by *Bifurcaria bifurcata* (Bb), *Cystoseira baccata* (Cb) and *Sargassum muticum* (Sm) at Pointe du Diable (PD) and Porsmeur (PM). W07: Winter 2007. Sp 07: Spring 2007. Su 07: Summer 2007. A 07: Autumn 2007. W 08: Winter 2008. Sp 08: Spring 2008.

Fig. 4: Pearson's correlation (r value, $p < 0.001$) to illustrate the relationships between Total Phenolic Content (TPC) and antiradical activity (EC50) in the native *Bifurcaria bifurcata*, *Cystoseira baccata* and the introduced *Sargassum muticum*

Fig. 5: Temporal variations of mean seawater temperature and mean salinity (A), mean PAR (B), mean NH_4 , NO_2 and NO_3 concentrations (C) and mean PO_4 concentration (D) for the Western Brittany (Data provided by "Service d'Observation en Milieu Littoral, INSU-CNRS, Brest" and "Marine Chemistry Team, Station Biologique de Roscoff, France").



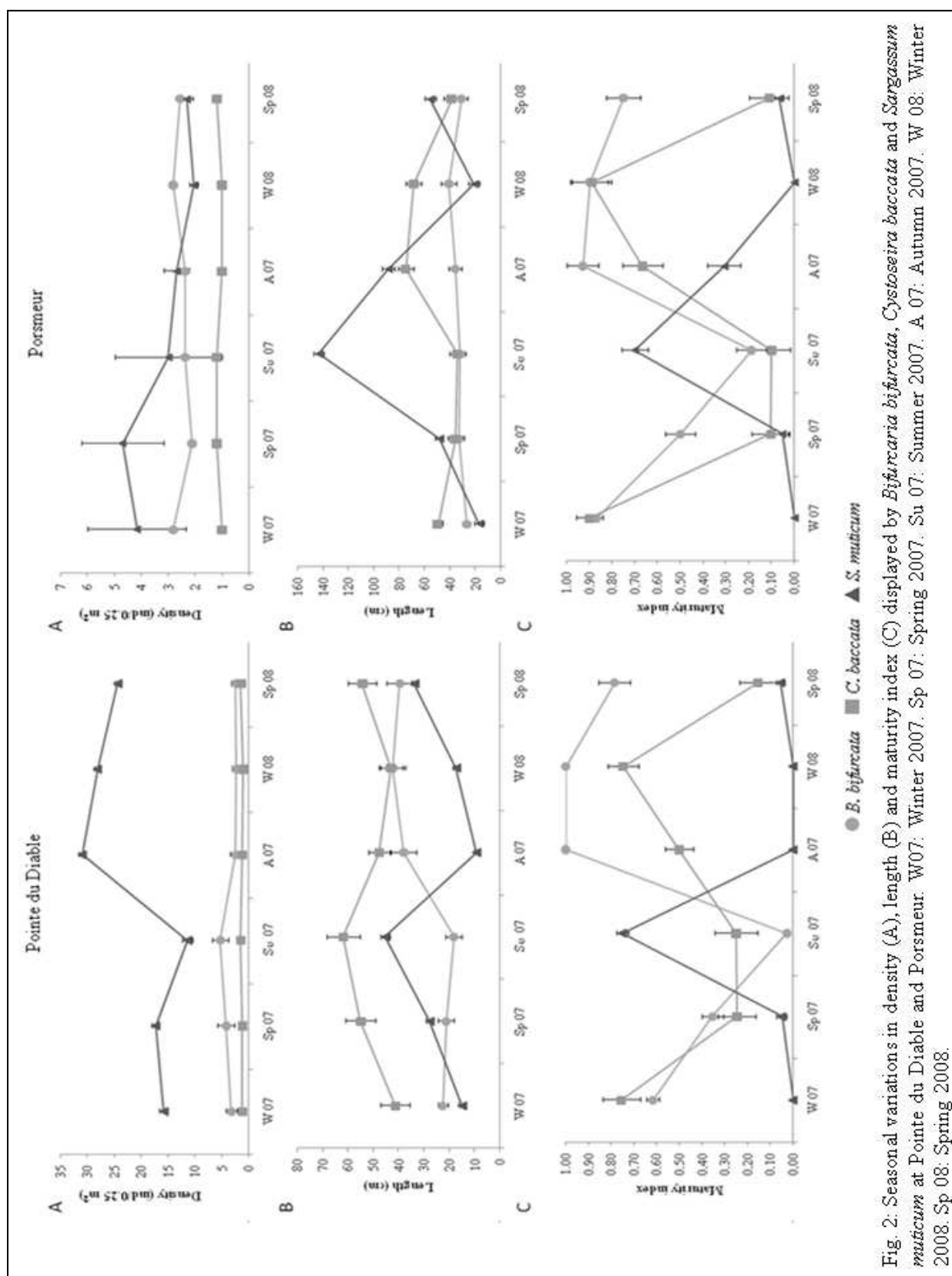


Fig. 2: Seasonal variations in density (A), length (B) and maturity index (C) displayed by *Bifurcaria bifurcata*, *Cystoseira baccata* and *Sargassum muticum* at Pointe du Diable and Porsmeur. W07: Winter 2007, Sp 07: Spring 2007, Su 07: Summer 2007, A 07: Autumn 2007, W 08: Winter 2008, Sp 08: Spring 2008.

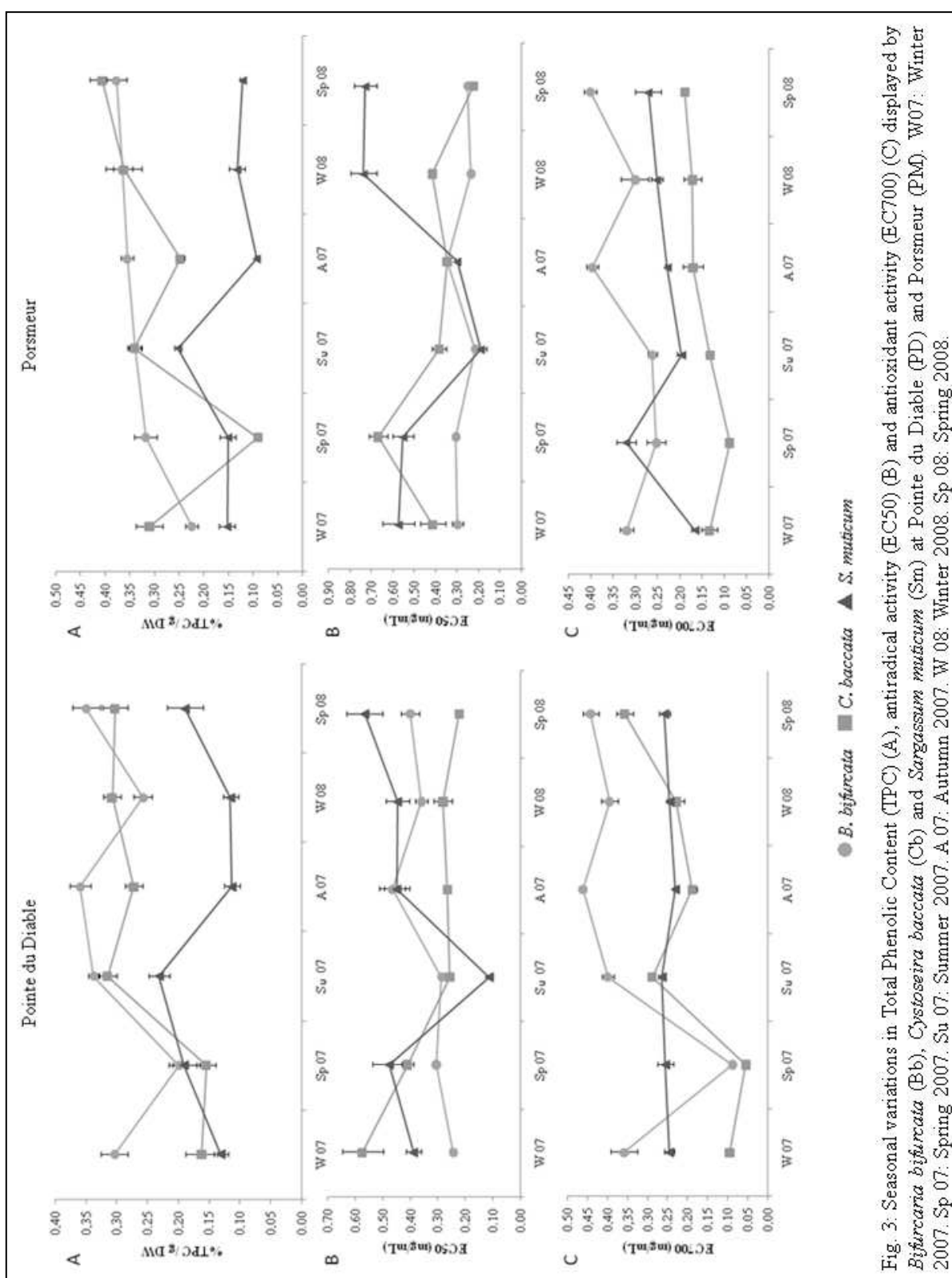


Fig. 3: Seasonal variations in Total Phenolic Content (TPC) (A), antiradical activity (EC50) (B) and antioxidant activity (EC700) (C) displayed by *Bifurcaria bifurcata* (Bb), *Cystoseira baccata* (Cb) and *Sargassum muticum* (Sm) at Pointe du Diable (PD) and Porsmeur (PM). W07: Winter 2007, Sp 07: Spring 2007, Su 07: Summer 2007, A 07: Autumn 2007, W 08: Winter 2008, Sp 08: Spring 2008.

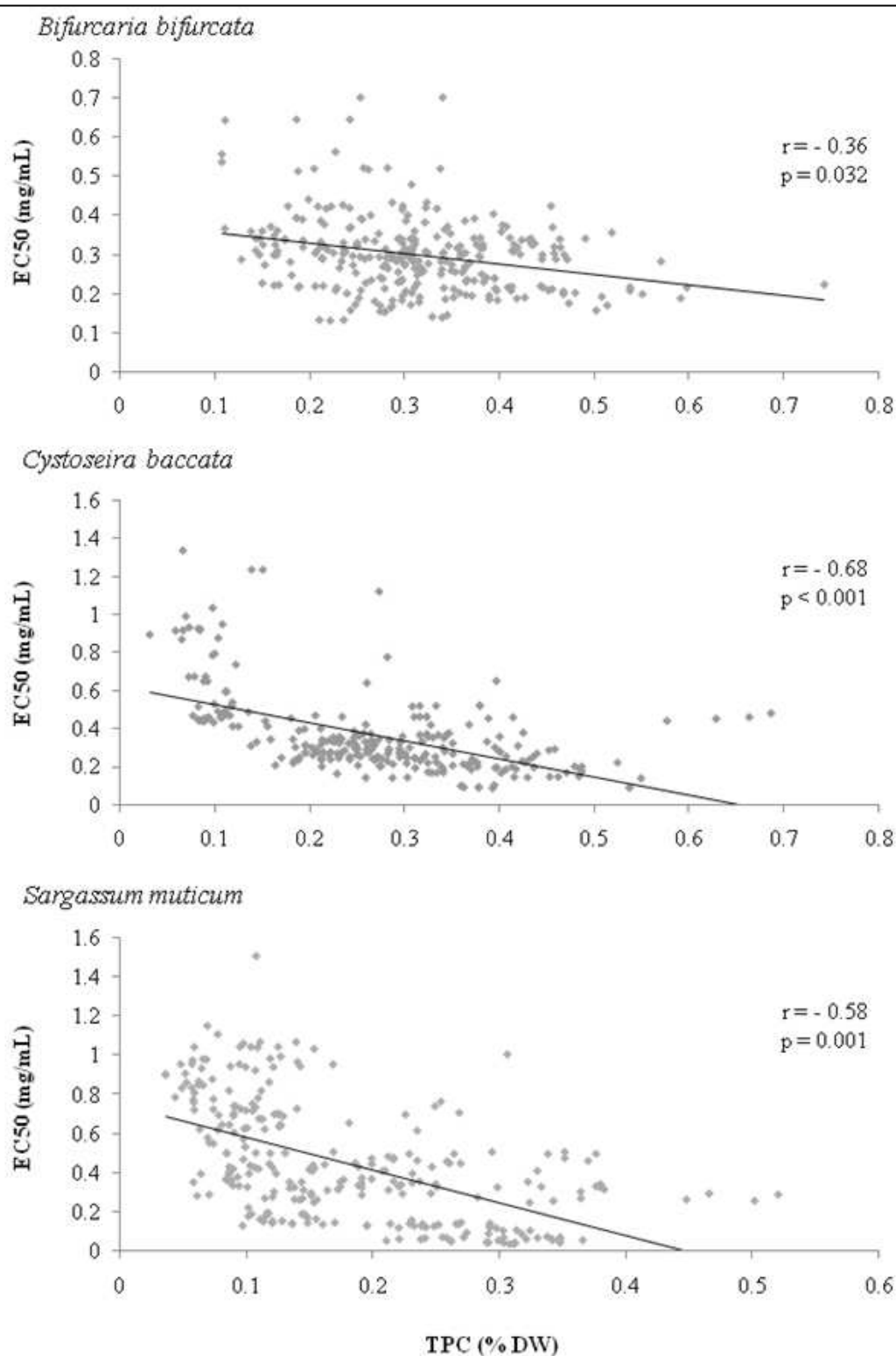


Fig. 4: Pearson's correlation (r value, $p < 0.001$) to illustrate the relationships between Total Phenolic Content (TPC) and antiradical activity (EC50) in the native *Bifurcaria bifurcata*, *Cystoseira baccata* and the introduced *Sargassum muticum*

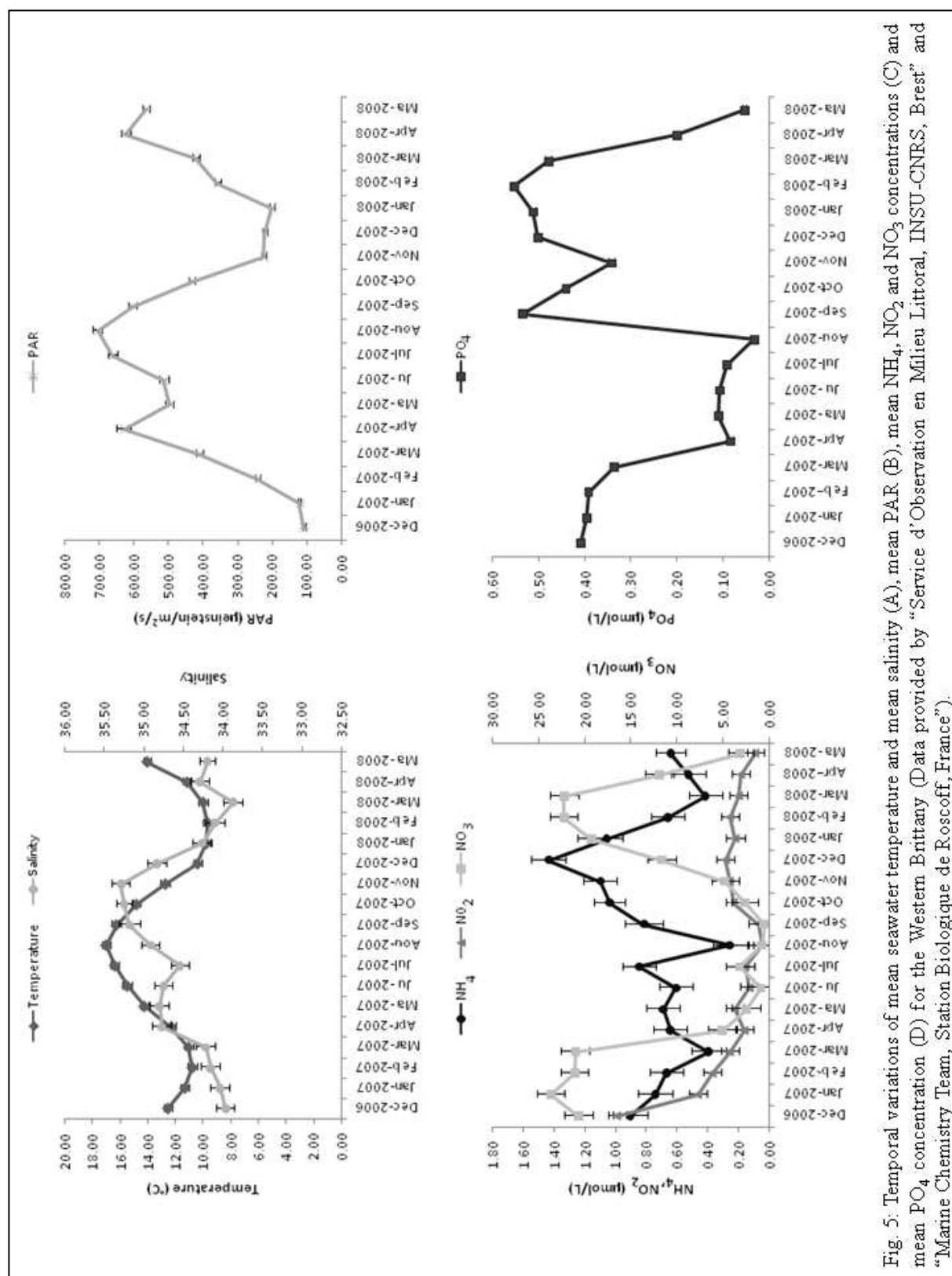


Fig. 5: Temporal variations of mean seawater temperature and mean salinity (A), mean PAR (B), mean NH_4^+ , NO_2^- and NO_3^- concentrations (C) and mean PO_4 concentration (D) for the Western Brittany (Data provided by "Service d'Observation en Milieu Littoral, INSU-CNRS, Brest" and "Marine Chemistry Team, Station Biologique de Roscoff, France").

List of tables legends

Table 1: Variations in density, length, maturity, Total Phenolic Content (TPC), antiradical activity (DPPH) and antioxidant activity (BCBM) in populations of *Bifurcaria bifurcata* (Bb), *Cystoseira baccata* (Cb) and *Sargassum muticum* (Sm) from Pointe du Diable (PD) and Porsmeur (PM)

Table 2: Variations in density, length, maturity, Total Phenolic Content (TPC), antiradical activity (DPPH) and antioxidant activity (BCBM) in populations of the native *Bifurcaria bifurcata*, *Cystoseira baccata* and the introduced *Sargassum muticum* from Pointe du Diable (PD) and Porsmeur (PM)

Table 3: Pearson's correlation (r value, $p < 0.001$) to illustrate the relation between length, Total Phenolic Content (TPC) or antiradical activity (EC50) and PAR, Temperature, Salinity, NH_4 , NO_3 , NO_2 or PO_4 concentrations in the introduced *Sargassum muticum*. ns: no significant correlation

Table 4: Pearson's correlation (r value, $p < 0.001$) to illustrate the relation between reproductive status and PAR, Temperature, Salinity, NH_4 , NO_3 , NO_2 or PO_4 concentrations in the native *Bifurcaria bifurcata* (Bb), *Cystoseira baccata* (Cb) and the introduced *Sargassum muticum* (Sm).

Table 5: Comparative phenologies of the Sargassaceae samples collected along the coast of Brittany.

Table 1: Variations in density, length, maturity, Total Phenolic Content (TPC), antiradical activity (DPPH) and antioxidant activity (BCBM) in populations of *Bifurcaria bifurcata* (Bb), *Cystoseira baccata* (Cb) and *Sargassum muticum* (Sm) from Pointe du Diable (PD) and Porsmeur (PM)

Variables	Test Stat	Fixed Factors				
			site	species	seasons	sites*species*seasons
Density (\sqrt{x})	3-way ANOVA	df	1586	1586	1586	1586
		F	223.05	336.34	0.7486	6.1375
		p	<0.001	<0.001	0.587	<0.001
			PM<PD	Cb<Bb<Sm	H1=E1<P1<P2<H2=A2	
Length (\sqrt{x})	3-way ANOVA	df	1586	1586	1586	1586
		F	43.388	26.302	12.744	8.3821
		p	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
			PM>PD	Sm<Bb<Cb	A2<H2<H1<P2=P1<E1	
Maturity Index	3-way ANOVA	df	1586	1586	1586	1586
		F	0.544	253.14	38.869	5.42
		p	0.46	<0.001	<0.001	<0.001
			PM=PD	Sm<Cb<Bb	P1=H2=P2=A2<H1<E1	
Phenolic content (ArcSin \sqrt{x})	3-way ANOVA	df	823	823	823	823
		F	0.971	174.55	68.86	10.55
		p	0.32	< 0.001	< 0.001	< 0.001
			PD=PM	Sm<Cb<Bb	A2=P2=E1<P1<H2<A1	
DPPH (ArcSin \sqrt{x})	3-way ANOVA	df	823	823	823	823
		F	3.79	32.55	46.96	4.68
		p	0.052	0.001	<0.001	<0.001
			PD<PM	Sm>Cb>Bb	P1≥P2=H2≥H1≥A2>E1>A1	
BCBM (ArcSin \sqrt{x})	3-way ANOVA	df	823	823	823	823
		F	50.09	291.41	49.562	7.2405
		p	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
			PM<PD	Cb<Sm<Bb	P1=A1<H1<E1=H2=A2<P2	

Table 2: Variations in density, length, maturity, Total Phenolic Content (TPC), antiradical activity (DPPH) and antioxidant activity (BCBM) in populations of the native *Bifurcaria bifurcata*, *Cystoseira baccata* and the introduced *Sargassum muticum* from Pointe du Diable (PD) and Porsmeur (PM)

species		<i>Bifurcaria bifurcata</i>				<i>Cystoseira baccata</i>				<i>Sargassum muticum</i>			
Variabl es	Test Stat	Fixed Factors			Fixed Factors			Fixed Factors					
		site	seasons	sites*seas ons	site	seasons	sites*seas ons	site	seasons	sites*seas ons			
Density (√x)	2-way ANOVA	d f	1142	1142	1142	d f	1142	1142	1142	d f	1142	1142	1142
		F	3.13	5.221	17.66	F	8.10	5.21	17.66	F	643.23	5.73	16.45
		p	0.08	<0.001	<0.001	p	0.05	<0.001	<0.001	p	<0.001	<0.001	<0.001
		PD=P M	P2=H2=A2<E1=P 1=H1			PD=P M	P1=P2=E1<H2=A2≤H 1			PD>P M	E1<H1=P1<P2<H 2=A2		
Length (√x)	2-way ANOVA	d f	1142	1142	1142	d f	1142	1142	1142	d f	1142	1142	1142
		F	0.007	1.90	6.94	F	0.93	1.90	6.94	F	173.61	54.28	24.82
		p	0.93	0.098	<0.001	p	0.07	0.098	<0.001	p	<0.001	<0.001	<0.001
		PD=P M	H1=P1=E1<A2=H 2=P2			PD=P M	H1=P1=E1=A2=H2=P 2			PD<P M	A2<H1=H2<P2=P 1<E1		
Maturity Index	2-way ANOVA	d f	1142	1142	1142	d f	1142	1142	1142	d f	1142	1142	1142
		F	1.18	28.64	1.79	F	0.078	13.51	3.52	F	2.20	142.43	7.41
		p	0.27	<0.001	0.11	p	0.13	<0.001	0.005	p	0.13	<0.001	<0.001
		PD=P M	E1<P1<H1≤P2=H 2=A2			PD=P M	P1=E1=P2≤A2≤H1=H 2			PD=P M	H2=H1≤A2≤P1=P 2<E1		
Phenolic content (ArcSin √x)	2-way ANOVA	d f	289	289	289	d f	245	245	245	d f	272	272	272
		F	9.58	16.98	11.12	F	12.64	31.1998	8.37	F	21.04	15.29	13.52
		p	0.002	< 0.001	< 0.001	p	< 0.001	< 0.001	< 0.001	p	<0.001	< 0.001	<0.001
		PD<P	P1=H1<H2<E1=A			PD<P	P1<H1=A2<E1=H2=P			PD>P	A2≤H1=H2≤P1=P		

		M	2=P2		M	2=A1		M	2<E1				
DPPH (ArcSin √x)	2-way ANOVA	d f	289	289	289	d f	245	245	245	d f	272	272	272
		F	221	9.21	9.56	F	8.39	17.58	4.87	F	19.79	42.97	0.91
		p	<0.001	<0.001	<0.001	p	0.004	<0.001	<0.001	p	<0.001	<0.001	0.47
		PD>P M	E1=H1<H2=P1≤A 2=P2			PD<P M	A1=P2<A2=E1=H2< H1<P1			PD<P M	E1<H1≤A2=P1≤H 2≤P2		
BCBM (ArcSin √x)	2-way ANOVA	d f	289	289	289	d f	245	245	245	d f	272	272	272
		F	7.38	54.94	20.27	F	25.43	32.24	10.44	F	3.05	7.84	6.14
		p	0.007	<0.001	<0.001	p	<0.001	<0.001	<0.001	p	0.08	<0.001	<0.001
		PD>P M	P1<E1=H1=H2<P 2=A2			PD>P M	P1≤A1≤H1<A2≤H2≤ E1<P2			PD=P M	H1≤A2=E1≤H2=P 2=P1		

Table 3: Pearson's correlation (r value, $p < 0.001$) to illustrate the relation between length, Total Phenolic Content (TPC) or antiradical activity (EC50) and PAR, Temperature, Salinity, NH_4 , NO_3 , NO_2 or PO_4 concentrations in the introduced *Sargassum muticum*. ns: no significant correlation

	PAR ($\mu\text{einstein/m}^2/\text{s}$)	Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	Salinity	NH_4 ($\mu\text{mol/L}$)	NO_3 ($\mu\text{mol/L}$)	NO_2 ($\mu\text{mol/L}$)	PO_4 ($\mu\text{mol/L}$)
Length	$r = 0.55$ $p = 0.001$	$r = 0.60$ $p < 0.001$	ns	ns	$r = -0.51$ $p = 0.001$	$r = -0.39$ $p = 0.018$	$r = -0.46$ $p = 0.005$
TPC	ns	$r = 0.40$ $p = 0.016$	ns	ns	$r = -0.45$ $p = 0.006$	ns	$r = -0.46$ $p = 0.005$
EC50	$r = -0.33$ $p = 0.045$	$r = -0.54$ $p = 0.001$	ns	ns	$r = 0.48$ $p = 0.003$	ns	$r = 0.43$ $p = 0.09$

Table 4: Salinity, NH_4 , NO_3 , NO_2 or PO_4 concentrations in the native *Bifurcaria bifurcata* (Bb), *Cystoseira baccata* (Cb) and the introduced *Sargassum muticum* (Sm).

	PAR ($\mu\text{einstein/m}^2/\text{s}$)	Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	Salinity	NH_4 ($\mu\text{mol/L}$)	NO_3 ($\mu\text{mol/L}$)	NO_2 ($\mu\text{mol/L}$)	PO_4 ($\mu\text{mol/L}$)
Bb	$r = -0.061$ $p < 0.001$	$r = -0.41$ $p = 0.0162$	ns	$r = 0.57$ $p < 0.001$	ns	$r = 0.37$ $p = 0.024$	$r = 0.68$ $p < 0.001$
Cb	$r = -0.71$ $p < 0.001$	$r = -0.44$ $p = 0.008$	ns	$r = 0.46$ $p = 0.005$	$r = 0.51$ $p = 0.001$	$r = 0.54$ $p = 0.001$	$r = 0.63$ $p < 0.001$
Sm	$r = 0.59$ $p < 0.001$	$r = 0.77$ $p < 0.001$	ns	ns	$r = -0.55$ $p < 0.001$	$r = -0.37$ $p = 0.024$	$r = -0.53$ $p = 0.001$

ns: no significant correlation

Table 5: Comparative phenologies of the Sargassaceae samples collected along the coast of Brittany.

	Species	Period of reproduction	Annual variation of growth	Hydrodynamism effect on density	Hydrodynamism effect on length	Maximum of TPC
native	<i>Bifurcaria bifurcata</i>	Autumn & Winter	Not really	No	No	Summer & Autumn
	<i>Cystoseira baccata</i>	Winter	Not really	No	No	Summer & Winter
alien	<i>Sargassum muticum</i>	Summer	Maximal length in Summer	Exposed site > Sheltered site	Exposed site < Sheltered site	Summer

Dans le manuscrit présenté ci-dessus, nous avons pu montrer que les trois espèces vivaient dans la même habitat et se partageaient les niches écologiques. C'est ce point que nous avons choisit de développer ci-après.

Comme l'indique la Figure 44, les trois espèces étudiées se répartissent l'espace au sein des sites. En effet, à la Pointe du Diable, *Bifurcaria bifurcata* se rencontre essentiellement au Sud et au Nord-Ouest de la mare, toujours sur le pourtour à l'interface air-eau ; *Cystoseira baccata*, elle, est présente au centre de la mare et sur le bord est. *Sargassum muticum* se distribue sur tout le pourtour de la mare avec une abondance plus importante au Nord. A Porsmeur, *Bifurcaria bifurcata* est présente sur les bords de l'écoulement, essentiellement sur le bord Ouest, alors que les deux autres espèces, *Sargassum muticum* et *Cystoseira baccata* privilégient les zones plus profondes (jusqu'à environ 60 cm à marée basse). *Sargassum muticum* est plus abondante à l'est de l'écoulement plutôt qu'à l'Ouest (cf. Fig.1, Le Lann et Stiger-Pouvreau (in review), p. 123).

Les trois espèces ne présentent pas non plus les mêmes évolutions saisonnières. Ainsi, le profil des mares étudiées varie au fur et à mesure des saisons (Figure 44) avec de grandes Sargasses (*Sargassum muticum*) en été (sa croissance débute au printemps) alors que les deux autres espèces présentent leurs plus petites tailles. *S. muticum* perd ses latérales en automne alors que les deux autres espèces, et essentiellement *C. baccata*, recommencent à croître pour atteindre leur taille maximale en hiver (Figure 44). Il est cependant important de noter, que ce n'est que le schéma général d'une évolution saisonnière des mares. Si tous les individus de *S. muticum* présentent la même saisonnalité très marquée dans les deux sites étudiés, les individus de *C. baccata* et *B. bifurcata*, ne montrent pas tous de saisonnalité. De plus, cette saisonnalité semble être fonction des sites. En effet, *C. baccata*, présente une évolution de la taille et de la maturité plus forte à Porsmeur qu'à la Pointe du Diable.

Il ressort de cette étude que l'espèce introduite *Sargassum muticum*, espèce pérenne par la base mais saisonnière par la biomasse représentée par ses latérales, présente une plasticité phénologique, contrairement aux deux espèces natives *Bifurcaria bifurcata* et *Cystoseira baccata*.

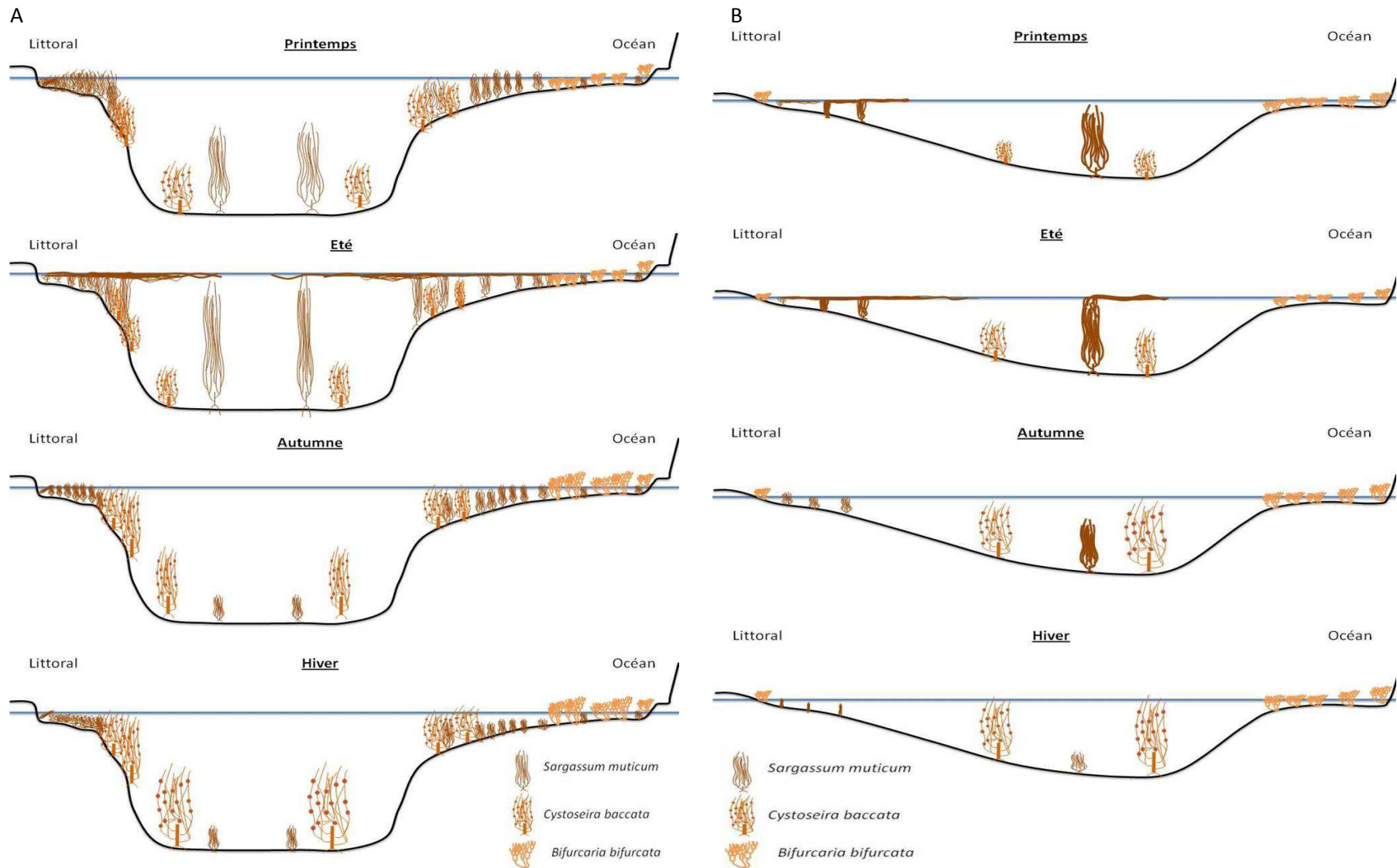


Figure 44: Evolution saisonnière des mares étudiées à la Pointe du Diable (A) et à Porsmeur (B), vue de profil. Ne sont représentées que les espèces étudiées : *S. muticum*, *C. baccata* et *B. bifurcata*.

2.2.2. Etude des classes de taille des composés phénoliques

D'un point de vue général, les composés de taille inférieure à 2000 Da sont majoritaires chez les espèces étudiées sauf chez *Cystoseira. baccata* récoltée en hiver 2007 à la Pointe du Diable (Figure 45). De plus les classes de taille des composés phénoliques varient significativement en fonction des espèces, du site et de la saison considérée (Anova, $p < 0,001$).

Les classes de taille des composés phénoliques de *C. baccata* varient en fonction du site et de la saison considérés (Anova, $p < 0,001$). Ainsi, en hiver, *C. baccata* récoltée à Porsmeur, montre une quantité de composés phénoliques dont la taille est comprise entre 2 000 et 5 000 Da supérieure à celle retrouvée chez la même espèce récoltée en hiver à la Pointe du Diable (respectivement $31,22 \pm 6,07$ % et $13,86 \pm 4,60$ %). De même, en été, chez *C. baccata* en provenance de la Pointe du Diable, les différentes classes de taille de composés phénoliques montrent des pourcentages semblables (inférieur à 2 000 Da : $26,55 \pm 10,41$ %, entre 2 000 et 5 000 Da : $29,65 \pm 6,47$ %, entre 5 000 et 12-14 000 Da : $19,55 \pm 2,82$ % et supérieur à 12-14 000 Da : $24,25 \pm 6,47$ %), alors que pour cette même saison, à Porsmeur, les petits composés phénoliques (< 2 000 Da) sont majoritaires ($67,27 \pm 6,53$ %).

Néanmoins, il n'y a pas de différence significative entre l'été et l'hiver en ce qui concerne le pourcentage de composés phénoliques inférieures à 2 000 Da chez *C. baccata* récoltée à Porsmeur (respectivement $67,27 \pm 6,53$ % et $64,12 \pm 5,64$ %), par contre la quantité de composés phénoliques compris entre 2 000 et 5 000 Da diminue (en été : $19,15 \pm 4,82$ % et en hiver : $31,22 \pm 6,07$ %) alors que celles des deux autres classes augmentent :

- entre 5 000 et 12-14 000 Da : $6,19 \pm 1,49$ % en été et $1,11 \pm 0,59$ % en hiver
- supérieur à 12-14 000 Da : $7,38 \pm 2,47$ % en été et $3,5 \pm 1,60$ % en hiver (Figure 45).

Chez *Bifurcaria bifurcata* la fraction la plus importante de composés de taille inférieure à 2000 Da est mesurée en été à la Pointe du Diable ($92,62 \pm 2,46$ %). Les composés phénoliques de cette espèce montrent une grande variabilité. En effet, les classes de taille varient en fonction du site et de la saison. Ainsi, à la Pointe du Diable, en été, la quantité de petits composés phénoliques, inférieurs à 2 000 Da augmente ($62,43 \pm 0,78$ % en hiver et $92,62 \pm 2,46$ % en été) alors que celle des phlorotannins compris entre 2 000 et 5 000 Da diminue par rapport à la quantité mesurée en hiver ($3,85 \pm 0,73$ % en été contre $33,62 \pm 2,69$ % en

hiver). En ce qui concerne les deux autres classes de tailles, aucune variation significative n'est détectée (test HSD). A Porsmeur, les deux classes de taille extrêmes ($< 2\,000$ Da et $> 12\text{-}14\,000$ Da) ne varient pas significativement entre l'été et l'hiver (respectivement $71,72 \pm 10,51$ % et $71,03 \pm 1,93$ % pour la classe de taille $< 2\,000$ Da et $7,27 \pm 1,69$ % et $12,82 \pm 2,73$ % pour la classe de taille $> 12\text{-}14\,000$ Da). Le pourcentage de composés phénoliques appartenant à la classe de taille comprise entre $2\,000$ et $5\,000$ Da augmente entre l'hiver et l'été (respectivement $6,06 \pm 2,39$ % et $15,87 \pm 5,47$ %) alors que celle des phlorotannins appartenant à la classe de taille comprise entre $5\,000$ et $12\text{-}14\,000$ Da diminue (respectivement $10,08 \pm 2,15$ % et $5,14 \pm 1,91$ %) (Anova : $p < 0,001$, test HSD, Figure 45).

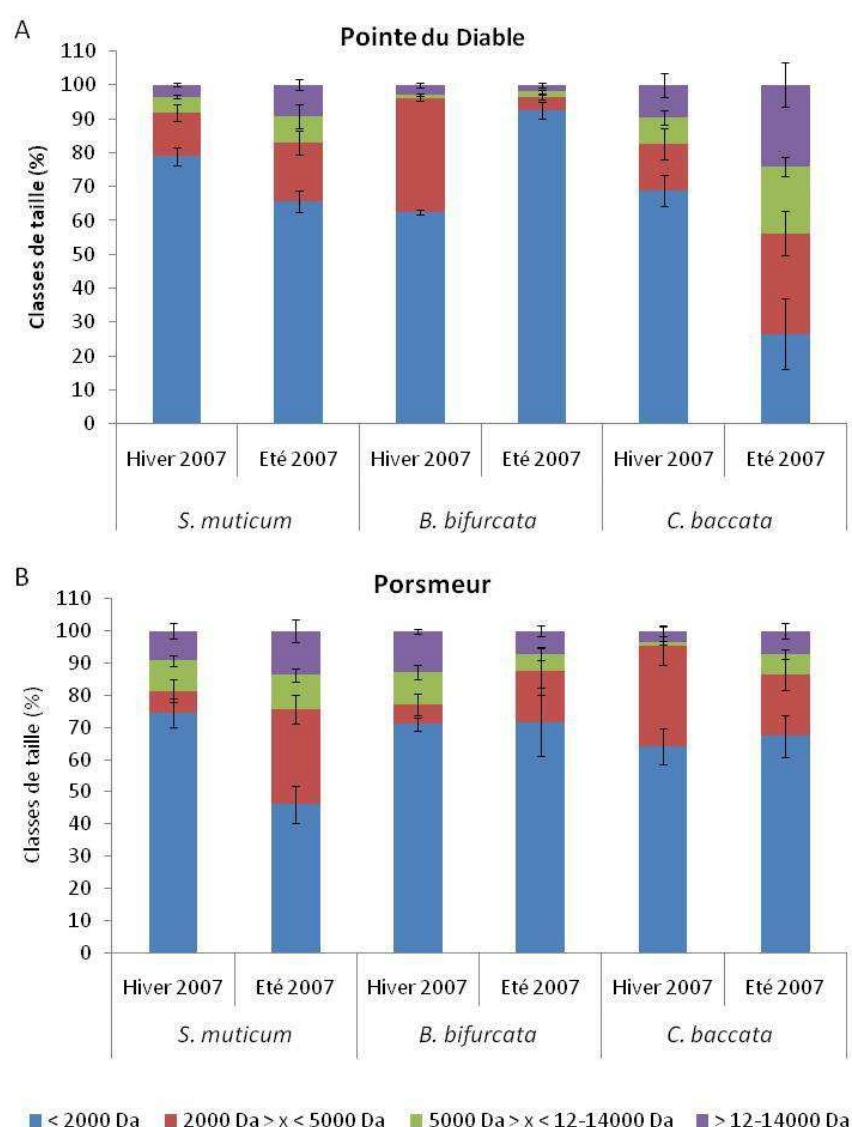


Figure 45 : Classes de taille des composés phénoliques exprimées en pourcentage pour *Cystoseira baccata*, *Bifurcaria bifurcata* et *Sargassum muticum* en fonction des sites. A : Pointe du Diable et B : Anse de Porsmeur en hiver et en été 2007. (Da : Dalton).

En été, les deux classes de taille les plus grandes ($> 12-14\ 000\text{ Da}$ et entre $5\ 000$ et $12-14\ 000\text{ Da}$) ne sont pas significativement différentes entre la Pointe du Diable et Porsmeur (respectivement $9,38 \pm 1,54\%$ et $13,68 \pm 3,54\%$ pour la classe de taille $> 12-14\ 000\text{ Da}$ et $7,75 \pm 3,54\%$ et $10 \pm 2,16\%$ pour la classe de taille entre $5\ 000$ et $12-14\ 000\text{ Da}$) alors que les composés phénoliques appartenant à la classe de taille entre $2\ 000$ à $5\ 000\text{ Da}$ sont en quantité plus importante à Porsmeur qu'à la Pointe du Diable (respectivement $29,66 \pm 4,39\%$ et $17,17 \pm 3,54\%$). Concernant les composés phénoliques de petites tailles ($< 2\ 000\text{ Da}$), ceux-ci sont mesurés en quantité plus importante à la Pointe du Diable qu'à Porsmeur (respectivement $65,69 \pm 3,19\%$ et $46,08 \pm 5,81\%$) (Anova : $p < 0,001$, Test HSD, Figure 45).

2.2.3. Variations spatio-temporelles des teneurs en fucoxanthine

Les teneurs en fucoxanthine varient en fonction de l'espèce, du site et de la saison considérée (Figure 46). En ne prenant pas en compte les valeurs du printemps 2008, les plus fortes teneurs de *Sargassum muticum* et *Cystoseira baccata* sont mesurées à Porsmeur avec respectivement $64,27 \pm 2,80\ \mu\text{g/g MS}$ et $56,18 \pm 3,87\ \mu\text{g/g MS}$. Pour *Bifurcaria bifurcata*, elles sont observées à la Pointe du Diable avec $52,33 \pm 1,64\ \mu\text{g/g MS}$.

Pour *S. muticum* et *C. baccata*, les variations saisonnières à la Pointe du Diable et à Porsmeur suivent les mêmes tendances (Figure 46 et Tableau 9), avec :

- pour *S. muticum*, des teneurs maximales enregistrées au printemps et des teneurs minimales mesurées en hiver ;
- pour *C. baccata*, des teneurs minimales observées au printemps et des maximales en automne (De plus, il est intéressant de noter les fortes teneurs mesurées au printemps 2008. Ces teneurs sont significativement supérieures aux autres teneurs mesurées au cours du suivi, pour *S. muticum* de la Pointe du Diable et de Porsmeur, pour *C. baccata* de la Pointe du Diable et pour *B. bifurcata* de Porsmeur (Anova : $p < 0,001$, Test HSD, Figure 46).

Les variations saisonnières des teneurs en fucoxanthine de *B. bifurcata*, sont bien marquées à la Pointe du Diable avec un maximum enregistré en été ($51,96 \pm 0,61\ \mu\text{g/g MS}$) et un minimum observé en automne ($22,42 \pm 1,94\ \mu\text{g/g MS}$), avec néanmoins un décalage observé entre l'année 2007 et l'année 2008 (Tableau 9). Par contre, cette évolution saisonnière des teneurs ne se retrouve pas à Porsmeur, où les teneurs en fucoxanthine croissent de manière plus ou moins régulière de l'hiver 2007 ($9,05 \pm 1,26\ \mu\text{g/g MS}$) au printemps 2008 ($51,53 \pm 2,24\ \mu\text{g/g MS}$).

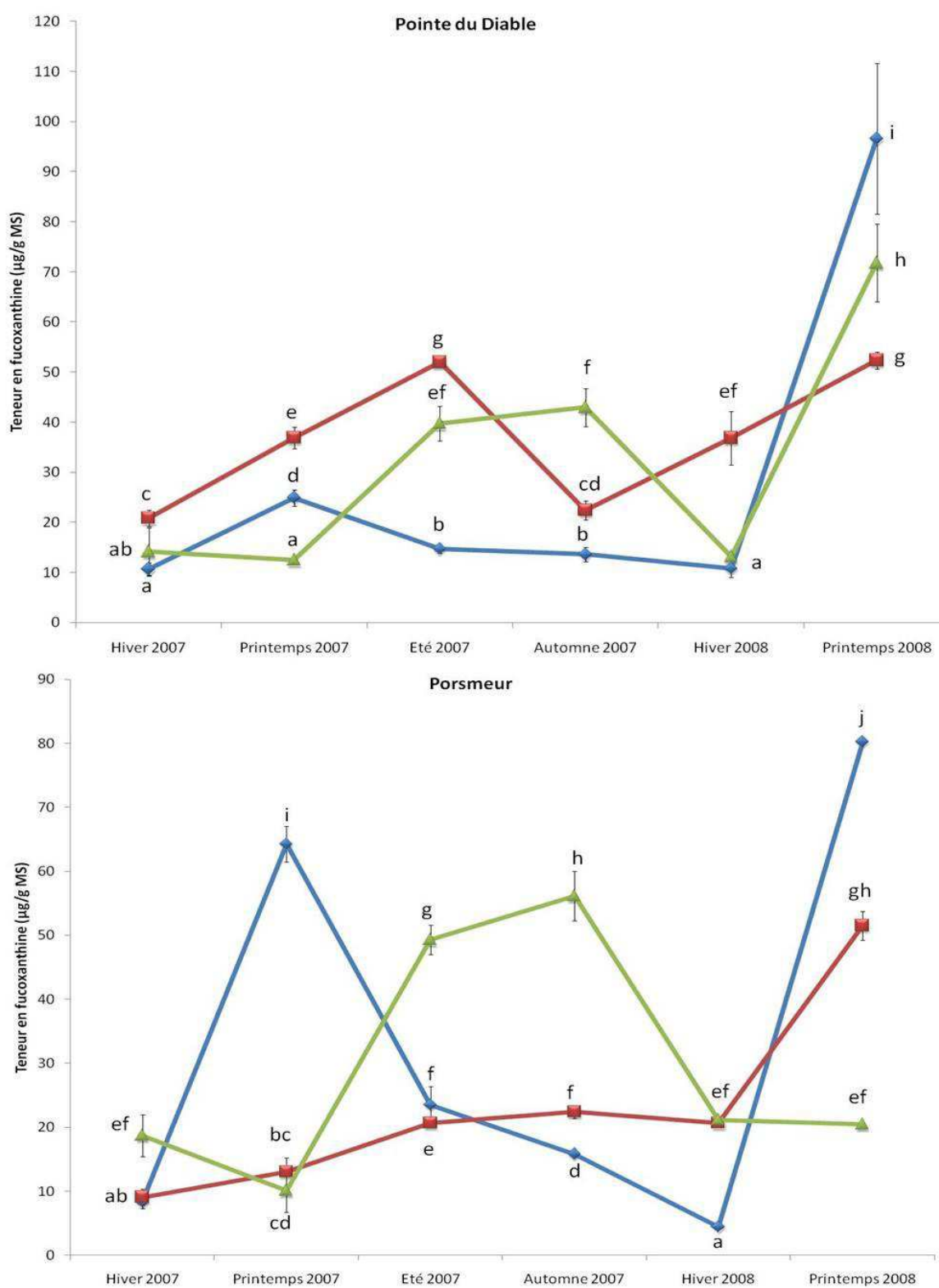


Figure 46: Variations spatio-temporelles des teneurs en fucoxanthine chez *Sargassum muticum* (■), *Cystoseira baccata* (▲) et *Bifurcaria bifurcata* (■), MS : matière sèche. Les lettres indiquent les différences significatives (Anova : $p < 0,001$, test HSD).

De plus, il est intéressant de noter les fortes teneurs mesurées au printemps 2008. Ces teneurs sont significativement supérieures aux autres teneurs mesurées au cours du suivi, pour *S. muticum* de la Pointe du Diable et de Porsmeur, pour *C. baccata* de la Pointe du Diable et pour *B. bifurcata* de Porsmeur (Anova : $p < 0,001$, Test HSD, Figure 46).

Tableau 9 : Valeurs maximales (en gras) et minimales des teneurs en fucoxanthine pour *Sargassum muticum*, *Cystoseira baccata* et *Bifurcaria bifurcata*, MS : matière sèche.

Espèces	Site	Saison	Année	Teneur en fucoxanthine ($\mu\text{g/g MS}$)
<i>Sargassum muticum</i>	Pointe du Diable	Hiver	2007	$10,67 \pm 1,23$
			2008	$10,82 \pm 1,80$
		Printemps	2007	$24,94 \pm 1,63$
			2008	$96,58 \pm 15,04$
	Porsmeur	Hiver	2007	$8,35 \pm 1,09$
			2008	$4,45 \pm 0,32$
		Printemps	2007	$64,27 \pm 2,80$
			2008	$80,24 \pm 0,18$
<i>Cystoseira baccata</i>	Pointe du Diable	Printemps	2007	$12,48 \pm 0,03$
		Hiver	2008	$13,18 \pm 0,18$
		Automne	2007	$42,94 \pm 3,78$
		Printemps	2008	$71,78 \pm 7,77$
	Porsmeur	Printemps	2007	$10,12 \pm 3,35$
			2008	$20,46 \pm 0,18$
		Eté	2007	$49,30 \pm 2,32$
		Automne	2007	$56,18 \pm 3,87$
<i>Bifurcaria bifurcata</i>	Pointe du Diable	Hiver	2007	$20,83 \pm 1,65$
		Automne	2007	$22,41 \pm 1,95$
		Eté	2007	$51,95 \pm 0,60$
		Printemps	2008	$52,33 \pm 1,64$
	Porsmeur	Hiver	2007	$9,05 \pm 1,26$
		Printemps	2007	$13,03 \pm 2,22$
		Automne	2007	$22,42 \pm 0,99$
		Printemps	2008	$51,53 \pm 2,24$

Les corrélations entre les teneurs en fucoxanthine et l'intensité lumineuse (PAR) ont été testées pour chaque espèce étudiée. Les résultats de ces corrélations (corrélation de Pearson) sont présentés dans le Tableau 10. Seule l'espèce introduite *Sargassum muticum* présente des teneurs en fucoxanthine significativement corrélées avec l'intensité lumineuse (corrélation de Pearson, $p < 0,001$).

Tableau 10 : Résultats des corrélations de Pearson testées entre les teneurs en fucoxanthine et l'intensité lumineuse (PAR) pour chaque espèce étudiées.

espèces	Corrélation de Pearson
<i>Sargassum muticum</i>	$r = 0,40$, $p < 0,001$
<i>Bifurcaria bifurcata</i>	$r = -0,05$, $p = 0,651$
<i>Cystoseira baccata</i>	$r = 0,03$, $p = 0,770$

2.2.4. Estimation de l'activité antiradicalaire des extraits pigmentaires des Sargassaceae tempérées

Tous les extraits pigmentaires présentent une activité antiradicalaire comme le montre la Figure 47, à titre indicatif.

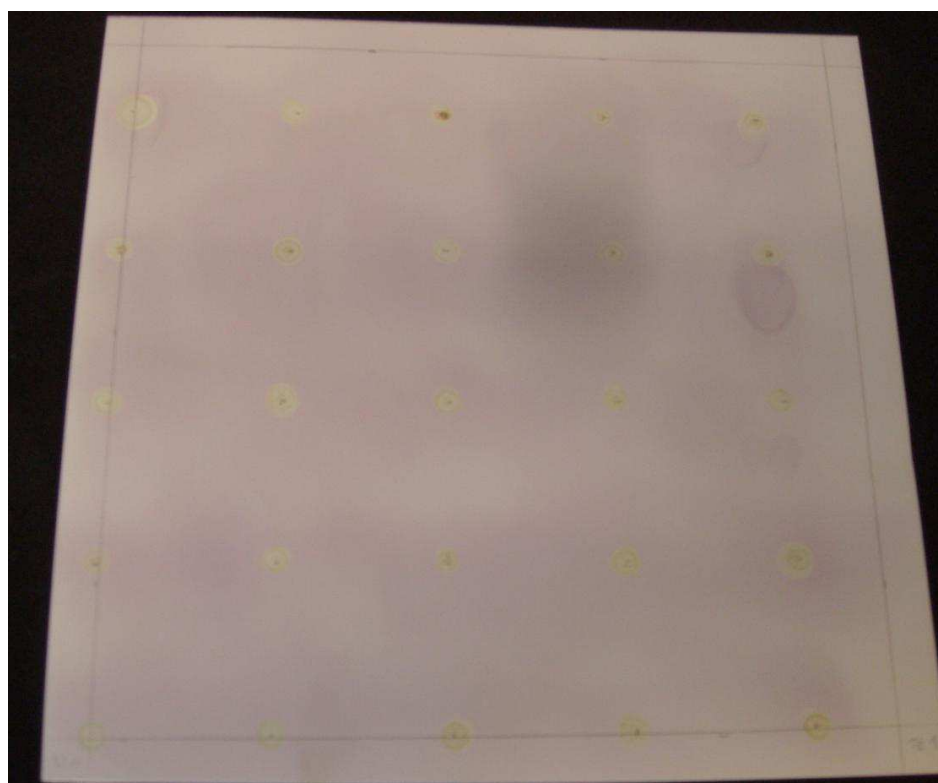


Figure 47 : Photographie de résultat du test DPPH sur plaque CCM permettant d'estimer l'activité antiradicalaire des extraits pigmentaires des Sargassaceae tempérées. Un extrait est considéré comme actif lorsqu'un halo blanchâtre se forme autour du dépôt.

Ainsi, quels que soit l'espèce, le lieu et la saison considérés, l'extrait pigmentaire, contenant de la fucoxanthine, montre une activité antiradicalaire, visible par le halo blanc autour des spots.

2.3. Ecologie chimique de Sargassaceae tropicales

2.3.1. Variabilité spatiale des teneurs en composés phénoliques

Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'un manuscrit soumis à **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. La référence de cet article, présenté p. 142, est :

Le Lann K, C Ferret, M Lhuillery, C Payri & V Stiger-Pouvreau (*in review*) Total phenolic contents and associated antioxidative activities in tropical Sargassaceae species (Fucales, Phaeophyceae) from the South Pacific Ocean: variability induced by biotic and abiotic factors. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **JEMBE-D-09-00381**.

Il résulte de cette étude sur les espèces de Sargassaceae en provenance du Pacifique Sud, que les teneurs en composés phénoliques totaux et les activités antiradicalaire et antioxydante associées varient avec le genre, le secteur géographique, la zone géomorphologique et la profondeur. Les corrélations significatives estimées entre les teneurs en composés phénoliques totaux et les activités antiradicalaire et antioxydante suggèrent, pour chaque espèce, une production qualitative et quantitative de phlorotannins en réponse aux paramètres environnementaux.

Total phenolic contents and associated antioxidative activities in tropical Sargassaceae species (Fucales, Phaeophyceae) from the South Pacific Ocean: variability induced by biotic and abiotic factors.

Klervi Le Lann^{1,2}, Claire Ferret^{1,2}, Marie Lhuillery^{1,2}, Claude Payri^{3,4} and Valérie Stiger-Pouvreau^{1,2}

¹ European University of Brittany (Université Européenne de Bretagne), France

² LEBHAM EA 3877, European Institute for Marines Sciences, University of Western Brittany, European University of Brittany (Université Européenne de Bretagne), Technopôle Brest-Iroise, 29280 Plouzané, FRANCE.

³ UMR 7138/UR R148 "Systématique, Adaptation, Evolution", Institut de Recherche pour le Développement, B.P. A5 98848, Nouméa Cedex, Nouvelle-Calédonie, France

⁴ Université de la Polynésie Française, Tahiti, France

Corresponding authors: Tel: 33 (0)2 998 49 87 73, Fax: 33 (0)2 98 49 97 72

Email: klervi.lelann@gmail.com (Klervi Le Lann) or valerie.stiger@univ-brest.fr (Valérie Stiger-Pouvreau)

Abstract

This study is about some *Turbinaria* and *Sargassum* algal species from three archipelagos of the South West Pacific Ocean. The total phenolic contents as well as the antiradical and antioxidant activities displayed by these algae were determined by the Folin-Ciocalteu method, the DPPH radical scavenging assay and the β -carotene bleaching method, respectively. Though the phenolic content and the antiradical and antioxidant activities proved to be low in both species, the levels in *Turbinaria* species were higher than in *Sargassum* ones, except in Fiji islands where both species produced similar contents. These investigations also highlighted spatial, geomorphologic and depth variations in total phenolic contents and associated activities together with a significant correlation between the total phenolic content and either the antiradical activity or the antioxidant one. These results are discussed in term of inter- and intra-specific variabilities: indeed, TPC and activity both proved to be affected by biotic and abiotic factors. The variations in both phenolic levels and associated activities noticed in tropical Sargassaceae species may come from a specific chemical defense settled by each genus. This chemical defense depends on the quality and/or quantity of phenolic compounds produced by each genus according to environment parameters.

Keywords: β -carotene, DPPH, phenolic content, *Sargassum*, *Turbinaria*.

Abbreviation: BCBM: β -carotene bleaching method, BHA: Butylated hydroxyl-anisole, BHT: Butylated hydroxyl-toluene, DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DW: dry weight, FI: Fiji Island, NC: New Caledonia, SI: Solomon Island, TPC: total phenolic content

1 - Introduction

Because of the rising and falling of the tide, intertidal seaweeds are exposed to considerable stress by the environment through elevation of irradiance level, changes in temperature and desiccation. This is why, typically, seaweeds sensitive or intolerant to environmental stress inhabit the lower intertidal zone (where emersion at low tide is brief and/or missing), whereas those found at higher elevations usually prove to better withstand environmental fluctuations. A prolonged exposure of seaweeds to high light intensities can damage their photosynthetic system, and then contribute to reduce the quantum efficiency of photosynthesis and to lower the maximum photosynthetic rates. Such damages are further escalated when they are coupled with desiccation and/or temperature stress (Davison et Pearson 1996). As a result, many intertidal seaweeds have developed mechanisms to prevent incurred lethal physiological damages and maintain their physiological integrity during and throughout emersion (Sampath-Wiley *et al.* 2008). Moreover, seaweeds are challenged by microorganisms, grazers and epiphytes at the origin of strong competition for substrates (Lobban et Harrison 1994, Potin *et al.* 2002) and liable to cause wounds and diseases (Potin *et al.* 2002, Lane et Kubanek 2008). So, to survive under these conditions, algae need to produce some environment-dependent chemical defense compounds (Hay 1996, Potin *et al.* 2002).

Among the molecules identified as chemical defense agents, the phlorotannins (or phenolic compounds), which are ubiquitous in plants, are known to be involved in the protection of marine algae against herbivores, pathogens and epiphytes (see review by Amsler et Fairhead 2006) as well as in photoprotection mechanisms (Pavia *et al.* 1997, Pavia et Brock 2000). Phenolic compounds may also protect cells against the oxidative damages caused by free radicals Wada et Ou 2002. Furthermore, correlations between total phenolic contents and some antioxidant activities have been described in fruits Vasco *et al.* 2008, plants Soobrattee *et al.* 2008 and seaweeds (Nakamura *et al.* 1996, Yan *et al.* 1996, Pavia *et al.* 1997, Lim *et al.* 2002, Nakai *et al.* 2006, Yuan et Walsh 2006, Connan *et al.* 2007, Chandini *et al.* 2008 for Phaeophyceae). The multiple functions of phenolic compounds (see Paul et Puglisi 2004 for a review) suggest that their production is governed by an interaction of several biotic and abiotic factors in temperate areas (Yates et Peckol 1993, Brock *et al.* 2001, Abdala-Díaz *et al.* 2006, Connan *et al.* 2007, Koivikko *et al.* 2008) as well as in tropical ones (Steinberg 1994, Jennings et Steinberg 1997, Pereira et Yoneshigue-Valentin 1999, Stiger et Payri 1999a, Arnold et Targett 2000, Zubia *et al.* 2008).

Environmental factors such as exposure to UV may also affect the antioxidant capacities developed by seaweeds. For example, the antioxidant activity displayed by three brown temperate seaweeds proved to be significantly dependent on intertidal levels (Connan *et al.*, 2007). Moreover, an elevation in the level of antioxidant compounds in the red alga, *Porphyra umbilicalis*, was noticed at emersion and whenever the temperature and irradiance level were the highest, *i.e.* in summer (Sampath-Wiley *et al.*, 2008).

Recent studies have been devoted to the phenolic contents in extracts of brown seaweeds from tropical regions (Stiger *et al.*, 2004, Zubia *et al.*, 2007, Zubia *et al.*, 2008) and to their antioxidant properties (see Zubia *et al.*, 2007 for a mini-review). On the other hand, the lack of information about total phenolic contents (TPC) and antioxidant capacities in macroalgae from South West Pacific Islands has led us to focus on this area because it offers an opportunity to study Sargassaceae species from Solomon Islands, New Caledonia and Fiji Islands.

The investigations reported here were, thus, aimed at gaining more insight into the spatial variations of both phlorotannin contents and their associated activities (antiradical and antioxidant) through assessments of the TPCs and antioxidant properties in relation with the conditions of life (geography and depth) of each species.

As DPPH radical scavenging assay and β -carotene bleaching method (BCBM) have been acknowledged as simple, fast and sensitive tests (Koleva *et al.* 2002), they were selected for assessment on extracts from Sargassaceae species. Moreover, among the available radical scavenging assays, the former is the most current one Turkmen *et al.* 2007).

2 – Experimental

2.1. Plant material

Adult specimens of six Sargassaceae species living in three different regions of the South Pacific, namely the Solomon Island (SI), New Caledonia (NC) and Fiji Island (FI), were collected over the austral winter (Table 1). The two geomorphological areas considered in this study were the fringing reef (FR) and the barrier reef (BR), moreover, a difference was made between three depth levels respectively defined as Surface (0 to 1 m), Intermediate (1 to 3 m) and Deep (3 to 6 m). The two genera under study were *Sargassum* and *Turbinaria*. The former presents a multi-axial arrangement with several flexible laterals, whereas the latter shows a single axial arrangement with a major rigid and erect axis. The field-collected samples were freeze-dried.

2.2. Phenolic extraction and assay

The phenolic compounds were extracted in a methanol/water mixture (50/50, v/v) at 40°C for 3 h under rotary agitation (60 rpm). The samples were centrifuged at 6 500 *g* (Sigma 3K10, Osterode, Germany) and evaporated at 40°C under vacuum with a Rotavapor system (R-3000, Büchi, Flawil, Switzerland) as described by Le Lann *et al.* 2008a.

TPC was determined by spectrophotometry (spectrophotometer Shimadzu UV 160A, Croissy, France) with an adapted Folin–Ciocalteu assay known to be less affected by interfering compounds than the classical one Sanoner *et al.* 1999. Interfering substances, however, are thought to account for less than 5% of the Folin–Ciocalteu-reactive compounds in brown seaweeds Toth et Pavia 2001b. Phloroglucinol (1,3,5-trihydroxybenzene from Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) was used as standard. To determine the TPC concentration in each extract, 3 aliquots of 500 μ L each were dried at 50-60°C for 48 h. In this study, TPCs are expressed as % phenolic compounds per dry weight (% DW).

2.3. Assessment of antioxidant activity by DPPH radical scavenging assay

The antiradical activities in Sargassaceae extracts were quantified by the DPPH radical scavenging assay modified according to Connan *et al.* 2006 and Turkmen *et al.* 2007.

Butylated hydroxyl-anisole (BHA), butylated hydroxyl-toluene (BHT) (respectively 2(3)-*t*-Butyl-4-hydroxyanisole and 2,6-Di-*tert*-butyl-4-methylphenol), ascorbic acid (L-ascorbic acid) and α -tocopherol (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) were used as positive controls. Briefly, various dilutions of the extracts were prepared in triplicate before addition to 20- μ L aliquots of $3.58 \cdot 10^{-3}$ M of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical (200 μ L). The mixture was stored in the dark for 60 min prior to the measurement of absorbance at 540 nm. Negative controls consisted of distilled water. All samples were assayed in triplicate.

Antioxidant activity was expressed as EC50 by reference to the half maximal effective concentration, *i.e.* the concentration of substrate that causes a 50% loss of the DPPH activity. A high EC50 is currently considered as indicative of a weak antioxidant activity and *vice-versa*.

2.4. Determination of antioxidant activity by β -carotene bleaching method

The antioxidant activity of extract samples and controls was measured by the β -carotene bleaching method (BCBM) modified according to Koleva *et al.* 2002 and Kaur et Kapoor 2002. Briefly, 2 mL of a β -carotene solution in chloroform (0.1mg/mL) were dispensed in round-bottom flasks that already contained 20 mg of linoleic acid and 200 mg of Tween 40. After evaporation with a rotavapor, oxygenated distilled water (50 mL) was added, and the mixture was shaken to form a liposome solution. This mixture was added to 12 μ L of extracts, or positive controls (BHA, BHT, ascorbic acid and α -tocopherol), or negative controls (distilled water and ethanol). The absorbance of the solution was measured at 450 nm, at first immediately ($t = 0$ min), and then after 2 hours at 50°C ($t = 120$ min). All samples were assayed in triplicate. Antioxidant activity was expressed through use of the antioxidant activity coefficient (AAC) as follows:

$$AAC = [(A_{s(120)} - A_{c(120)}) / (A_{c(0)} - A_{c(120)})] \times 1000$$

where $A_{s(120)}$ is the absorbance of the antioxidant mix at $t = 120$ min, $A_{c(120)}$ is the absorbance of the control at $t = 120$ min, and $A_{c(0)}$ is the absorbance of the control at $t = 0$ min. Since the positive controls, BHA and BHT had all an average AAC of 700, this value was arbitrarily chosen to express the antioxidant activity through reference to EC700, which was thus considered as the concentration of substrate needed to get an AAC value of 700 (Le Lann *et al.*, 2008). Furthermore, the lower EC700 is, the stronger the antioxidant activity is, and *vice-versa*.

2.5. Statistics

The software "Statistica 8" for PC was used for every statistical analysis. All laboratory analyses were performed in triplicate, and results are presented as mean values \pm standard deviation (SD). Homogeneity of variance was tested with the Cochran test at the 0.05 significance level. Data were arcsine (square-root) transformed to satisfy the ANOVA requirements Underwood 1997. Then, two-way ANOVA tests were performed on the data about TPC, antiradical and antioxidant capacities on using genera and archipelagos, geomorphology or depth as factors. In the case of significant difference between data, a Tukey's test at $p < 0.05$ was used as *post-hoc* test.

Moreover, the correlations between TPC and the extract-displayed antioxidant capacity (EC50 or EC700) were also tested by Pearson's correlation (r value, $p < 0.001$) to determine whether TPC was implicated in the antiradical activity (measured by the DPPH method) and/or in the antioxidant activity (measured by the BCBM).

3. Results

The mean TPC, antiradical and antioxidant activity values relative to each sample of *Turbinaria* and *Sargassum* species are given in Table 2.

Moreover, Figs.1-3 illustrate the relationships in both genera between the TPC/antioxidative activities and the impact by either the geographical location of the sampling points, or their geomorphology, or their depths.

3.1. Total phenolic content

A thorough reading of Table 2 highlights great variations between the mean TPC values of *Turbinaria* and *Sargassum* samples according to the archipelagos. Indeed, in Solomon Islands, the highest TPC ($1.639 \pm 0.091\%$ DW) is displayed by *Turbinaria* conoides from Lau Lagoon, whereas the lowest one ($0.080 \pm 0.017\%$ DW) is exhibited by *Sargassum* cristaeifolium from Anuta Paina Island. In New Caledonia, the highest TPC ($1.589 \pm 0.174\%$ DW) is found in *T. conoides* from Prony 2, whereas the lowest one ($0.156 \pm 0.006\%$ DW) corresponds to *S. aquifolium* from Prony 1. Similar results are found in the Fiji Islands with the highest TPC ($0.954 \pm 0.073\%$ DW) in *T. ornata* from Vanua Levu 1 and the lowest one ($0.090 \pm 0.003\%$ DW) in *S. polycystum* from Vanua Levu 2.

3.1.1. Effects by genus and geographical location

The TPCs of the Sargassaceae species under study varied significantly with their genus ($p < 0.001$), but no effect was detected by geographical location ($p = 0.273$). Nevertheless, the finding of a significant interaction (two-way Anova, $p < 0.001$) between genus and geographical location indicates that the differences in TPCs observed over the genus are archipelago-dependent (Fig. 1A). For *Turbinaria*, the highest and the lowest TPC values ($1.062 \pm 0.045\%$ DW and $0.578 \pm 0.072\%$ DW) were found in New Caledonia and Fiji Islands, respectively. Concerning *Sargassum*, the situation is the reverse one with the highest and lowest TPC values in Fiji Islands ($0.609 \pm 0.064\%$ DW) and New Caledonia ($0.160 \pm 0.056\%$ DW), respectively. In both genera, intermediate values were measured in samples from Solomon Islands ($0.898 \pm 0.056\%$ DW for *Turbinaria* and $0.272 \pm 0.060\%$ DW for *Sargassum*). One should also note a significantly higher production of phenolic compounds by *Turbinaria* compared to *Sargassum* in Solomon Islands and New Caledonia. On the other hand, in Fiji Islands, no significant difference was found between the TPC values in *Sargassum* and *Turbinaria* samples (Tukey's test, Fig. 1A).

3.1.2. Effects by genus and geomorphology

In the Sargassaceae species under study, though geomorphology appeared to have no significant effect on their TPCs ($p = 0.100$), a two-way Anova test showed that the interaction between genus and geomorphology was significant ($p = 0.002$), this means that the differences in TPCs noticed over the genus are dependent on the geomorphology (FR or BR). Comparisons of TPC in *Turbinaria* and *Sargassum* with respect to the geomorphology (Fig.1B) evidenced several differences: i) a decrease in the TPCs of *Turbinaria* between FR and BR ($1.038 \pm 0.046\%$ DW and

$0.765 \pm 0.052\%$ DW, respectively) conversely to *Sargassum* where no variation was noticed ($0.322 \pm 0.048\%$ DW in the BR against $0.400 \pm 0.064\%$ DW in the FR) (Tukey's test), ii) a production of phlorotannins by *Turbinaria* always greater than the one by *Sargassum*.

3.1.3. Effects by genus and depth

The TPCs of Sargassaceae species proved to significantly vary with depth ($p < 0.001$). Moreover, the significant interaction found between genus and depth (two-way Anova, $p = 0.008$) is in favour of an effect by depth on the TPCs.

Figure 1C shows that, in the two genera under study, TPCs decreased with depth. Moreover, at any depth (S, I or D), *Turbinaria* produced always more phenolic compounds than *Sargassum*: $1.252 \pm 0.085\%$ DW (S), $0.886 \pm 0.036\%$ DW (I) and $0.721 \pm 0.093\%$ DW (D) for *Turbinaria* against $0.661 \pm 0.055\%$ DW (S), $0.147 \pm 0.051\%$ DW (I) and $0.154 \pm 0.063\%$ DW (D) in *Sargassum* (Tukey's test).

3.2. Antiradical activity (DPPH)

Table 2 gives the mean EC50 values measured in *Turbinaria* and *Sargassum* extracts. It highlights great similarities between the TPCs values and the antiradical activities. Indeed, as previously noticed in Solomon Islands, the highest and lowest antiradical activities are displayed by *Turbinaria* conoides from Lau Lagoon ($EC_{50} = 2.436$ mg/mL) and *Sargassum* cristaefolium from Anuta Paina Island ($EC_{50} = 179,304 \pm 11.126$ mg/mL), respectively, in New Caledonia, they are exhibited by *T. conoides* from Prony 2 ($EC_{50} = 2.801 \pm 1.159$ mg/mL) and *S. aquifolium* from Prony 1 ($EC_{50} = 74.632 \pm 7.069$ mg/mL), respectively, and in Fiji Islands, by *T. ornata* from Vanua Levu 1 ($EC_{50} = 7.419 \pm 2.476$ mg/mL) and *S. polycystum* from Vanua Levu 2 ($EC_{50} = 101.799 \pm 9.126$ mg/mL), respectively.

3.2.1. Effects by genus and geographical location

The antiradical activities displayed by Sargassaceae extracts proved to vary significantly with genus ($p < 0.001$) and geographical location ($p = 0.04$). Moreover, the significant interaction found between both parameters (two-way Anova, $p < 0.001$) indicates an interaction between the geographical location and the differences in antioxidant activities observed over the genus.

Concerning the genus, *Turbinaria*, Fig. 2A clearly shows that the lowest EC50 value ($EC_{50} = 5.119 \pm 2.316$ mg/mL) is found in New Caledonia, and then in Fiji Islands ($EC_{50} = 7.418 \pm 2.506$ mg/mL). The highest one ($EC_{50} = 32.487 \pm 6.562$ mg/mL) is in Solomon Islands. The pattern observed for *Sargassum* genus is quite different with the highest antioxidant activity ($EC_{50} = 50.521 \pm 7.518$ mg/mL) in Fiji Islands and the lowest one ($EC_{50} = 69.677 \pm 6.810$ mg/mL) in New Caledonia. The EC50 values measured in samples from Solomon Islands ($EC_{50} = 61.664 \pm 7.088$ mg/mL) are in-between. At last, whatever the archipelago, *Turbinaria* extracts showed significantly higher antiradical activities than *Sargassum* ones (Tukey's test).

3.2.2. Effects by genus and geomorphology

The antiradical activities displayed by the Sargassaceae species under study varied significantly according to the genus ($p < 0.001$), but not with the geomorphology ($p = 0.224$). Nevertheless, the finding of a significant interaction (two-way Anova, $p < 0.001$) between both parameters suggests that, within a genus, the antiradical activity is affected by the geomorphology at the sampling site, *i.e.* fringing reef or barrier reef.

Figure 2B shows that the impact by geomorphology on the antiradical activities is significant in *Turbinaria* species and greater than in *Sargassum* ones extracts ($EC_{50} = 5.036 \pm 2.026$ mg/mL (FR) and 26.032 ± 5.638 mg/mL (BR) against

63.292 ± 5.169 mg/mL (FR) and 57.548 ± 6.966 mg/mL (BR), respectively). Whatever the geomorphology, the antiradical capacities of *Turbinaria* were higher than those of *Sargassum* (Tukey's test).

3.2.3. Effects by genus and depth

The antioxidant activities of Sargassaceae extracts varied significantly according to genus or depth ($p < 0.001$). Moreover, within a genus, the antioxidant activities proved to be dependent on the depth along the water column ($p < 0.001$, two-way Anova).

In the two genera under study, Fig. 2 C highlights the reduction of antiradical activity with depth. In *Turbinaria*, it is very marked with far much lower EC50 values in the surface layer (S) and at the intermediate depth (3.442 ± 2.207 and 6.814 ± 2.945 mg/mL, respectively) than within the deep layer (D) (76.524 ± 10.007 mg/mL). The EC50 values obtained in *Sargassum*, i.e. 41.535 ± 6.027 mg/mL (S), 73.800 ± 5.526 mg/mL (I) and 74.632 ± 10.086 mg/mL (D), suggest a lack of impact by depth on antiradical activity. Moreover, in the two upper layers, the antiradical capacities of *Turbinaria* were always significantly higher than those of *Sargassum* genus (Tukey's test, Fig. 2C), except in the deep layer where no significant difference was found between both genera (Tukey's test).

3.3. Antioxidant activity (BCBM)

Table 2 lists the mean EC700 values found for the different samples of *Turbinaria* and *Sargassum*. In Solomon Islands, the highest and lowest antioxidant activities are displayed by *Turbinaria conoides* from Lau Lagoon (EC700 = 2.612 ± 1.446 mg/mL) and those from Nggela NW (EC700 = 11.147 ± 1.446 mg/mL), respectively. In New Caledonia, they are displayed by *T. conoides* from Prony 2 (EC700 = 2.763 ± 1.203 mg/mL) and *S. aquifolium* from Prony 1 (EC700 = 23.734 ± 1.120 mg/mL), respectively, and in Fiji Islands, by *T. ornata* from Vanua Levu 1 (7.144 ± 0.868 mg/mL) and *S. polycystum* from Vanua Levu 2, (EC700 = 51.612 ± 1.446 mg/mL).

3.3.1. Effects by genus and geographical location

The antioxidant activities of the Sargassaceae extracts under study varied significantly with genus ($p < 0.001$) and with the geographical location ($p < 0.001$). Moreover, the finding of a significant interaction between genus and archipelago (two-way Anova, $p < 0.001$) means that the differences in antioxidant activities noticed over the genus depend on the archipelago under consideration. (are archipelago-dependent)

Concerning the genus *Turbinaria*, Fig. 3A clearly shows that the most active extract (EC700 = 4.007 ± 1.159 mg/mL) comes from New Caledonia, whereas the less active one (EC700 = 7.144 ± 1.854 mg/mL) is from Solomon Islands. The EC700 values measured in samples from Fiji Islands (EC700 = 5.480 ± 1.431 mg/mL) are in-between. The pattern observed for *Sargassum* genus is quite different since the highest antioxidant activity is exhibited by samples from Fiji Islands (EC700 = 3.909 ± 1.545 mg/mL) and the lowest one by those from New Caledonia (EC700 = 36.215 ± 1.639 mg/mL), the activity displayed by the samples from Solomon Islands (EC700 = 16.999 ± 1.435 mg/mL) lies between these extreme values.

Moreover, in Solomon Islands and in New Caledonia, the antioxidant activities of *Turbinaria* were significantly higher than those of *Sargassum* genus (Tukey's test, Fig. 3A). In Fiji Islands, the lack of significant difference between the EC700 values of both genera drove us to consider the extracts as being active (Tukey's test, Fig. 3A).

3.3.2. Effects by genus and geomorphology

In Sargassaceae species, the antioxidant capacities proved to vary significantly according to the genus ($p < 0.001$) and the geomorphology ($p = 0.024$). Moreover, the differences in EC700 noticed over the genus were dependent on the geomorphology, *i.e.* FR or BR, (interaction tested as significant by the two-way Anova, $p < 0.001$).

Figure 3B deals with the comparison of the antioxidant activities exhibited by Sargassaceae extracts according to the geomorphology. It highlights that: (i) the antioxidant activities by *Turbinaria* extracts lie in the same range whatever the geomorphology (EC700 = 5.318 ± 1.651 , BR against 4.87 ± 1.471 mg/mL, FR) conversely to those by *Sargassum* extracts, which are more geomorphology-sensitive (EC700 = 14.330 ± 2.039 , BR against 20.551 ± 1.513 mg/mL, FR), and (ii) whatever the geomorphology, the activities by *Turbinaria* extracts are always greater than those by *Sargassum* extracts (Tukey's test).

3.3.3 Effects by genus and depth

In the Sargassaceae extracts under study, though depth appeared to have no significant effect on their antioxidant activities ($p = 0.066$), the genus - depth interaction proved to be significant (two-way Anova test, $p = 0.003$). It means that the depth had an impact on the antioxidant activities noticed over the genus.

Concerning the genus *Turbinaria*, the antioxidant activities showed no strong variations in relation with depth, *i.e.* EC700 = 7.379 ± 2.957 mg/mL (S), 4.965 ± 1.267 mg/mL (I) and 3.049 ± 1.239 mg/mL (D). Moreover, the differences observed were not significant (Tukey's test, Fig. 3C). On the other hand, in the genus *Sargassum*, the antioxidant activity in samples from the Intermediate layer (EC700 = 14.842 ± 1.774 mg/mL) was higher than in those from the Surface and Deep layers (EC700 = 20.582 ± 1.935 and 23.734 ± 3.239 mg/mL, respectively). It is also worth noting that along the water column, *Turbinaria* extracts proved to have always significantly higher activities than *Sargassum* ones (Tukey's test, Fig. 3C).

3.4. Correlation between TPC and antiradical/antioxidative activities

Pearson's correlation tests evidenced significant negative correlations between the phenolic contents of extracts and their antiradical capacities ($r = -0.66$, $p < 0.001$, Fig. 4A) or their antioxidant capacities ($r = -0.22$, $p < 0.001$, Fig. 4B). The samples that exhibited the highest TPCs were those with the highest antiradical activity or the highest antioxidant capacity (respectively assessed by EC50 and EC700 values): *T. conoides* (from Lau Lagoon, Solomon Islands and from Prony 2, New Caledonia) and *T. ornata* (from Vanua Levu, Fiji Island). Conversely, among the samples with the lowest TPCs, *S. aquifolium* (from Prony 1, New Caledonia) and *S. polycystum* (from Vanua Levu 2, Fiji Islands) both displayed the lowest antiradical activities and the lowest antioxidant capacities, and the antioxidant capacity exhibited by *S. cristaefolium* (from Anuta Paina Island, Solomon Islands) was also very low.

4. Discussion

4.1. Total Phenolic content

The levels of TPCs measured in this study are in agreement with the literature about tropical and subtropical *Turbinaria* and *Sargassum* species (Stiger *et al.* 2004, Zubia *et al.* 2007, Zubia *et al.* 2008). The great variability observed within both genera may be induced by abiotic and/or biotic factors as shown by the synthesis diagram proposed in (Fig. 5) according to the literature.

The differences in TPCs between genera appeared to depend on the geographical location: indeed, in Solomon Islands and New Caledonia, the finding of significantly higher TPCs in *Turbinaria* species than in *Sargassum* ones is consistent with previous studies carried out on samples from this geographical area (Steinberg 1986, Van alstyne et Paul 1990, Stiger *et al.* 2004). On the other hand, in Fiji Islands, the TPCs were at similar levels in *Turbinaria* and *Sargassum* species, this is in agreement with investigations by others in India Kesava Rao et Untawale (1991) and in the Caribbean Targett *et al.* (1992). There is a consensus among these authors about the impact of environmental factors on the phenolic content of brown algae.

In Fucaceae, the existence of a negative relationship between tissue nitrogen and phlorotannins levels populations of *Fucus vesiculosus*, but not in those of *Ascophyllum nodosum*, was reported by Pavia and Toth (2000). A literature review shows no consensus among authors about a link between phlorotannin concentration and nutrient availability: indeed, some of them Arnold *et al.* (1995), Peckol *et al.* (1996), Stiger *et al.* (2004) described an elevation of phlorotannin concentration in nutrient-rich waters conversely to others Pavia *et al.* (1997), Pavia et Brock (2000), Pavia et Toth (2000b) who casted doubt on the existence of some connection between nutrient availability and phlorotannin concentrations. It is worth noting that, in this study, because of their location, the sampling sites set on the fringing reef were more exposed to anthropogenic and terrigenous effects than those on the barrier reef. This could explain the high TPCs measured in the samples of *Turbinaria* species from the fringing reef, but it is contradicted by the lack of geomorphological variation within the genus of *Sargassum*. The effect generated by nutrient levels seems to depend on the genus or species.

About the impact of depth on TPCs, numerous evidences of a significant effect on phlorotannin levels (enhanced production of phenolic compounds) further to exposure of brown algae to UV radiations (quantity and quality) are available in the literature Solar radiation is attenuated along the seawater column, and a reduction of unweighted

UV-B radiation from 1.5 m to depth was reported in a coral reef environment Shick *et al.* 1996. An attenuation of UV ray penetration, in quantity and quality, could explain why, in the *Sargassum* species under study, TPCs were significantly higher in the upper layer (S) than at the deeper one (D). According to certain studies (see Table 3) irradiance could be directly related to secondary metabolism.

The finding by Jormalainen and Honkanen (2004) that the fitness of *Fucus vesiculosus* is dependent on phlorotannin levels drove them to assume the existence of a fitness cost for the production of polyphenolic compounds and to suggest that this cost would vary from a given environment to another one. Concerning the present study, the measurement of higher TPCs in *Turbinaria* samples from the fringing reef compared to those from the barrier reef is in total agreement with the results reported by Stiger and co-workers (2004) about *Turbinaria ornata*, where such a difference was explained by a greater grazing activity in the fringing reef. This is consistent with another study Targett et Arnold 1998, where phlorotannins and phenolic contents were respectively affected by the chemical environment of a herbivore gut and by spatial- and time-variations in environmental parameters, e.g. nutrients, irradiance,

intensity of herbivory, within a given locality.

Herbivory pressure is known to elevate the concentration in phenolic compounds in the brown algae of temperate waters, (e.g. Svensson *et al.* 2007). On the other hand, in tropical waters, the role of grazers in the production of phenolic compounds is still unclear. Indeed, in tropical and sub-tropical brown seaweeds, the concentrations in phenolic compounds appear to be too low to deter herbivores (Steinberg 1986, Steinberg et Paul 1990, Fleury *et al.* 1994, Pereira et Yoneshigue-Valentin 1999). However, the removal of *Sargassum* sp. and *Turbinaria* ornata from the Great Barrier Reef (Australia) by herbivorous reef fish was recently reported Mantyka et Bellwood (2007).

Whatever the factor under study (geographic location, geomorphological situation or depth) TPC of *Turbinaria* were numerically always higher than TPC of *Sargassum*. It is worth wondering whether they may result from the morphological differences observed between *Turbinaria* and *Sargassum* species: indeed, the thallus of the former has a main erect and rigid axis whereas, in *Sargassum*, it consists of several flexible laterals able to sweep the substratum around their respective basis. In this last genus, diffusing repellent products are released by *Sargassum* parents at a lower level than in *Turbinaria*. This observation drove Stiger *et al.* (2004) to assume the development, by parents, of a defensive mechanical and chemical protection of zygote settlement in *Sargassum* against a simple chemical protection (rigid texture and liberation of diffusible molecules) in *Turbinaria* to protect against herbivores. Moreover, Jormalainen et Honkanen (2004) demonstrated the existence of genetic variation and phenotypic plasticity in phenolic compounds.

To conclude about TPC variability, the correlation between TPC, local environment factors (UV radiation, grazing intensity, nutrient levels) and intrinsic factors (genetic variations, age, ontogenic stage) would be stronger than the one with larger scale factors (latitudinal gradients, seasons) because of the complexity of spatial variations.

4.2. Antiradical and antioxidant capacities

None of the species under study displayed high antiradical and antioxidative activities. This observation is in contradiction with the data available about Sargassaceae species from tropical and sub-tropical regions (Anggadiredja *et al.* 1997, Santoso *et al.* 2004, Zubia *et al.* 2007, Zubia *et al.* 2008). Three among these studies also reported the finding of a high, but variable, antioxidant activity by *Turbinaria* species (Santoso *et al.*, 2004, Zubia *et al.*, 2007, Zubia *et al.*, 2008). Nevertheless, some Sargassaceae extracts from South West Pacific Island from our study demonstrated an interesting antioxidant potential with a low oxidation index close to these from the control α -tocopherol (Table 2).

The huge variability in antioxidant capacities observed, here, among extracts is in agreement with the one found at very small scale in temperate brown algae Connan *et al.* 2006. Even though the antiradical or antioxidant activities exhibited by the extracts from Sargassaceae were low, it is worth noting the significant and negative correlations found between TPC and antiradical activity or antioxidant activity. This observation is in agreement with various studies about fruits (Velioglu *et al.* 1998, Jimenez-Escrig *et al.* 2001, Connan *et al.* 2006, Connan *et al.* 2007). Moreover, the antioxidant defenses of macroalgae can be affected by abiotic stress (ollèn et Davison 1999, Contreras *et al.* 2005). Nevertheless, according to other authors, the protective capability developed by brown algae would rather depend on other secondary metabolites. Indeed, macroalgae contain many other antioxidant compounds such as tocopherols, ascorbic acid, carotenoids, phospholipids, chlorophyll-related compounds, mycosporines-like amino acids or polysaccharides (Zubia *et al.*, 2008). Among those isolated from Sargassaceae species, in particular in the genus *Sargassum*, meroterpenoids from *S. siliquastrum* (Jang *et al.* 2005), plastoquinones from *S. micracanthum* (Iwashima *et al.* 2005) and some aromatic compounds from *S. thunbergii* (Seo *et al.* 2004) were identified.

Among Fucales, some antioxidative pigments were isolated from Fucaceae species Le Tutour *et al.* 1998 as well as galactolipids Deal *et al.* 2003 and identified as deterrent molecules implicated in the chemical defense of *Fucus vesiculosus*.

One should note that, in the present study, the results obtained by the DPPH assay and BCBM were not alike. A comparison of the ability of the DPPH test and BCBM in the assessment of antioxidant activity highlighted the substrate hydro/lipophilicity-independent character of the DPPH test. (Koleva *et al.*, 2002). BCBM proved to be hampered by complex interfacial phenomena resulting from interactions (synergistic, additive or antagonistic effects) between the chemical components of the sample under study and/or the medium phase (Koleva *et al.* 2002). Different types of antioxidants can be assayed by the two methods, but one must be aware that DPPH gives clues about the levels of both lipophilic and hydrophilic compounds. On the other hand, BCBM is indicative of only the levels of lipophilic compounds (Chew *et al.* 2008). By way of consequence, the results obtained in this study suggest that the phenolic compounds are not responsible for most of the antioxidative activity, but are rather implicated in the production of lipophilic compounds such as pigments, like, for example, fucoxanthin, which is known to be a good antioxidant (Yan *et al.* 1999).

Furthermore, the relationship between TPC and EC50 could be related to the fact that Folin-Ciocalteu assay and DPPH test are both based on redox balances in phenols Huang *et al.* 2005. However, Connan and co-workers (2007) mentioned the putative implication of phlorotannins structures, especially their polymerization degree in the antiradical activity, indeed, small phenolic compounds are generally less active than highly polymerized compounds (Nakamura *et al.* 1996). Moreover, the chemical activities of phenolic compounds as hydrogen- or electron-donating agents are indicative of their potential for action as antioxidant (Rice-Evans *et al.* 1997). Consequently, the antiradical activity, measured by the DPPH assay, may constitute a qualitative approach of the TPC.

5. Conclusion

In this study about tropical Sargassaceae species from Pacific areas, the total phenolic contents and associated antiradical and antioxidative activities proved to vary with the genus, the geographic area, the geomorphological zone and the depth level. The significant correlations found between TPCs and antiradical or antioxidant activities suggest that these variations could result from a qualitative and quantitative production of phlorotannins by each species in response of environmental parameters.

Acknowledgment

This study is part of the PhD work carried out by the first author at IUEM (UBO) within the Laboratory of Ecophysiology and Biotechnology of Halophytes and Marine algae (LEBHAM EA 3877) under the supervision of the last author. A part of this research was supported by the Coral Reef Initiative Program for South Pacific (CRISP) and by the French Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. This contribution is referenced as No. xxxx of the European Institute for Marine Studies (IUEM, Brest, France). The authors sincerely thank M.P. Friocourt for fruitful help in the English writing of this manuscript. Additional thanks are addressed to the fourth author, Pr. Claude Payri and colleagues from IRD Nouméa, for the collection and conditioning of the seaweed samples.

References : voir la partie Bibliographie p. 301

Table 1: Description of sampling areas with dates of sampling and name of species

Geographical area	Sampled species	Sampling date	Site	Depth	Geomorphology	Remarks/observations
Solomon Islands	<i>S. aquifolium</i> <i>S. cristaefolium</i> <i>T. ornata</i> <i>T. decurrens</i>	18/07/04	Malaita, east cost. Anuta Paina Island	Surface Deep	Fringing Reef Barrier Reef	Coastal area of coral reef flat Coral bottoms
	<i>T. decurrens</i> <i>S. aquifolium</i>	16/07/04	Malaita north.	Intermediate	Fringing Reef	Reef flat edge. Inner area of the pass. Seagrass meadow.
	<i>T. conoides</i>	17/07/04	Lau Lagoon	Surface	Barrier Reef	Seagrass meadow barrier reef.
	<i>T. conoides</i> <i>S. aquifolium</i>	12/07/04	Nggela NW	Surface	Fringing Reef	Fringing coastal reef flat, top of rocks, backwash area.
New Caledonia	<i>S. aquifolium</i>	13/06/07	Prony 1	Deep	Fringing Reef	Fall of fringing coral reef flat
	<i>S. aquifolium</i> <i>T. conoides</i>	12/06/07	Prony 2	Intermediate	Fringing Reef	Fringing coral reef flat
	<i>T. ornata</i> , <i>T. conoides</i>	26/05/06	Quinné, Bay of Cap Tonnede	Intermediate	Fringing Reef	Fringing coral reef flat, High terrigenous influence
Fiji Islands	<i>T. ornata</i>	15/05/07	Vanua Levu 1	Intermediate	Barrier reef	Flagstone and roughly sand coral reef flat with madrepor patch, inner slope of reef flat.
	<i>S. polycystum</i>	16/05/07		Surface	Fringing Reef	Muddy sand reef flat with seagrass meadows and some areas of detritic coral blocks, long thalli of <i>Sargassum sp.</i> , reef flat across a village.
	<i>S. polycystum</i>	17/05/07	Vanua Levu 2	Intermediate	Barrier Reef	Intermediate reef flat
	<i>S. polycystum</i>	24/05/07	Ngau	Surface	Barrier Reef	Edge of mangrove. Silted up reef flat with detritic blocks and coral border, coastal reef flat across a village

Table 2: Total Phenolic Content (TPC) and associated antiradical (EC50) and antioxidant (EC700) activities of the species collected in South Pacific Islands (mean \pm standard deviation, n = 9). The differences found to be significant by HSD - Tukey ($p < 0.05$) are indicated by different letters.

Locality			species	TPC (% dry wt)	EC50 (mg/mL)		EC700 (mg/mL)		
Solomon Islands	Anuta Island	Paina	<i>T. decurrens</i>	1.027 ± 0.074	g	8.004 ± 3.126	c	2.892 ± 1.446	bc
			<i>T. ornata</i>	0.262 ± 0.009	ab	89.325 ± 8.177	f	3.286 ± 1.771	bcd
			<i>S. cristaeifolium</i>	0.080 ± 0.017	a	179.304 ± 11.126	g	4.991 ± 1.446	bcd
			<i>S. aquifolium</i>	0.205 ± 0.01	a	36.802 ± 9.026	cde	3.046 ± 1.446	bc
	Lau Lagoon	<i>T. decurrens</i>	0.484 ± 0.036	bc	17.183 ± 5.126	cd	5.732 ± 1.446	bcd	
		<i>T. conoides</i>	1.639 ± 0.091	h	2.436 ± 1.126	c	2.612 ± 1.446	bc	
		<i>S. aquifolium</i>	0.097 ± 0.01	a	100.000 ± 9.261	f	3.721 ± 1.446	bc	
	Nggela NW	<i>T. conoides</i>	0.865 ± 0.204	efg	4.449 ± 1.213	c	11.147 ± 1.446	de	
		<i>S. aquifolium</i>	0.708 ± 0.074	ced	9.854 ± 3.422	c	4.879 ± 1.446	bcd	
New Caledonia	Prony 1	<i>S. aquifolium</i>	0.156 ± 0.006	a	74.632 ± 7.069	ef	23.734 ± 1.120	f	
	Prony 2	<i>S. aquifolium</i>	0.164 ± 0.010	a	66.581 ± 5.588	ef	12.790 ± 0.885	e	
		<i>T. conoides</i>	1.589 ± 0.174	h	2.801 ± 1.159	c	2.763 ± 1.203	b	
	Ouiné	<i>T. ornata</i>	0.837 ± 0.036	def g	8.273 ± 3.640	c	4.303 ± 1.052	bc	
		<i>T. conoides</i>	0.964 ± 0.047	fg	4.429 ± 1.695	c	4.335 ± 0.744	bc	
Fiji Islands	Vanua Levu 1	<i>T. ornata</i>	0.954 ± 0.073	efg	7.419 ± 2.476	c	7.144 ± 0.868	bcd	
		<i>S. polycystum</i>	0.743 ± 0.211	a	55.069 ± 8.255	de	49.818 ± 1.308	g	
	Vanua Levu 2	<i>S. polycystum</i>	0.090 ± 0.003	a	101.799 ± 9.126	f	51.612 ± 1.446	g	
	Ngau	<i>S. polycystum</i>	0.589 ± 0.114	cd	7.895 ± 2.903	c	9.116 ± 1.252	cde	
BHA			-		0.068 ± 0.007	a	0.204 ± 0.042	a	
BHT			-		0.094 ± 0.023	a	0.213 ± 0.046	a	
ascorbic acid			-		0.078 ± 0.009	ab	0.238 ± 0.040	a	
α-tocopherol			-		0.122 ± 0.007	b	10.197 ± 0.122	d	

For each archipelago, the highest TPC, antiradical and antioxidant values are written in bold, whereas the lowest TPC, antiradical and antioxidant values are in italic.

Table 3: Abiotic and biotic factors liable to affect the total phenolic content (TPC).

	Factors	Specie	Reference
Abiotic	Latitude		Targett <i>et al.</i> , 1992
	Geomorphology	<i>Turbinaria ornata</i>	Stiger <i>et al.</i> , 2004
		<i>Sargassum mangarevense</i>	
	Light		Pavia et Brock, 2000
		<i>Ascophyllum nodosum</i>	Pavia and Toth, 2000
		<i>Fucus vesiculosus</i>	Peckol <i>et al.</i> , 1996
		<i>Fucus gardneri</i>	Henry and Van Alstyne, 2004
		<i>Desmarestia anceps</i>	Fairhead <i>et al.</i> , 2006
		<i>Desmarestia meniesii</i>	
	Hydrodynamim	<i>Sargassum muticum</i>	Plouguerné <i>et al.</i> , 2006
	emersion/immersion cycle time	<i>A. nodosum</i>	Connan <i>et al.</i> , 2007
		<i>Bifurcaria bifurcata</i>	
		<i>Pelvetia canaliculata</i>	
	Nutrient levels		Pavia <i>et al.</i> , 1997
		<i>A. nodosum</i>	Pavia et Brock, 2000
			Svensson <i>et al.</i> , 2007
			Peckol <i>et al.</i> , 1996
		<i>F. vesiculosus</i>	Pavia et Toth 2000
		<i>Lobophora variegata</i>	Arnold <i>et al.</i> , 1995
		<i>T. ornata</i>	Stiger <i>et al.</i> , 2004
		<i>S. mangarevense</i>	
	Seasons	<i>A. nodosum</i>	Ragan et Jensen, 1978
		<i>Sargassum muticum</i>	Plouguerné <i>et al.</i> , 2006
		<i>T. ornata</i>	Stiger <i>et al.</i> , 2004
		<i>S. mangarevense</i>	
		<i>Cystoseira tamariscifolia</i>	Abdala-Diaz <i>et al.</i> , 2006
Biotic	Growth	<i>T. ornata</i>	Stiger <i>et al.</i> , 2004
		<i>S. mangarevense</i>	
	Reproduction	<i>T. ornata</i>	Stiger <i>et al.</i> , 2004
		<i>S. mangarevense</i>	
		<i>S. muticum</i>	Plouguerné <i>et al.</i> , 2006

Morphology (Chemical/morphological/structural defense)	<i>T. ornata</i>	Stiger <i>et al.</i> , 2004
	<i>S. mangarevense</i>	
Energy allocation	<i>F. vesiculosus</i>	Jormalainen and Henkanen, 2004
Herbivory		Pavia <i>et al.</i> , 1997
	<i>A. nodosum</i>	Pavia et Brock, 2000
		Svensson <i>et al.</i> , 2007
	<i>Cystoseira trinodis</i>	
	<i>Dictyopteris australis</i>	Steinberg et Paul, 1990
	<i>Dictyota spiralis</i>	
	<i>Ecklonia radiata</i>	Lüder et Clayton, 2004
	<i>Fucus gardneri</i>	Henry and Van Alstyne, 2004
		Yates et Peckol, 1993
	<i>F. vesiculosus</i>	Deal <i>et al.</i> , 2003
		Jormalainen and Henkanen, 2004
	<i>Fucus distichus</i>	Van Alstyne, 1988
	<i>Glossophora kunthii</i>	Macaya <i>et al.</i> , 2005
	<i>L. variegata</i>	Steinberg et Paul, 1990
	<i>Macrocystis integrifolia</i>	Macaya <i>et al.</i> , 2005
	<i>Padina sp.</i>	
		Steinberg et Paul, 1990
	<i>Sargassum sp.</i>	
		Steinberg, 1986
	<i>Sargassum furcatum</i>	Pereira et Yoneshigue-Valentin, 1999
	<i>S. mangarevense</i>	Stiger <i>et al.</i> , 2004
	<i>Turbinaria sp.</i>	Steinberg, 1986
	<i>T. ornata</i>	Stiger <i>et al.</i> , 2004
	Mini review	Targett et Arnold, 1998
Epiphytism	<i>A. nodosum</i>	Brock <i>et al.</i> , 2001
Larval settlement	<i>F. vesiculosus</i>	Brock <i>et al.</i> , 2007
Plant density	<i>A. nodosum</i>	Svensson <i>et al.</i> , 2007

List of figures legends

Figure 1: Effect by geographical location (A), geomorphology (B) and depth (C) on the Total Phenolic Contents (TPCs) of *Turbinaria* and *Sargassum* genera. TPCs are expressed in % of the dry weight (DW). The differences found to be significant by HSD - Tukey ($p < 0.05$) are indicated by different letters.

Figure 2: Effect by geographical location (A), geomorphology (B) and depth (C) on the antiradical activity displayed by *Turbinaria* and *Sargassum* extracts. Antiradical activity is expressed as EC50 (mg/mL). The differences found to be significant by HSD - Tukey ($p < 0.05$) are indicated by different letters. See Table 2 for the activity of positive controls (BHA, BHT, ascorbic acid and α -tocopherol)

Figure 3: Effect by geographical location (A), geomorphology (B) and depth (C) on the antioxidant activity exhibited by *Turbinaria* and *Sargassum* extracts. Antioxidant activity is expressed as EC700 (mg/mL). The differences found to be significant by HSD - Tukey ($p < 0.05$) are indicated by different letters. See Table 2 for the activity of positive controls (BHA, BHT, ascorbic acid and α -tocopherol)

Figure 4: Correlations between the TPC (% DW) in extracts of Sargassaceae species and either their antiradical activity (EC50) (A) or their antioxidant capacity (EC700) (B). The Pearson correlations were found to be significant ($p < 0.001$) in both cases.

Figure 5: Synthesis diagram about biotic and abiotic factors liable to affect the total phenolic content (TPC). Please, see Table 3 for some references. *Sargassum polycystum* C. Agardh thallus is according to Mattio, 2008 and *Turbinaria ornata* (Turner) J. Agardh thallus is according to Stiger, 1997. Scale bars: 3 cm.

Figure 1

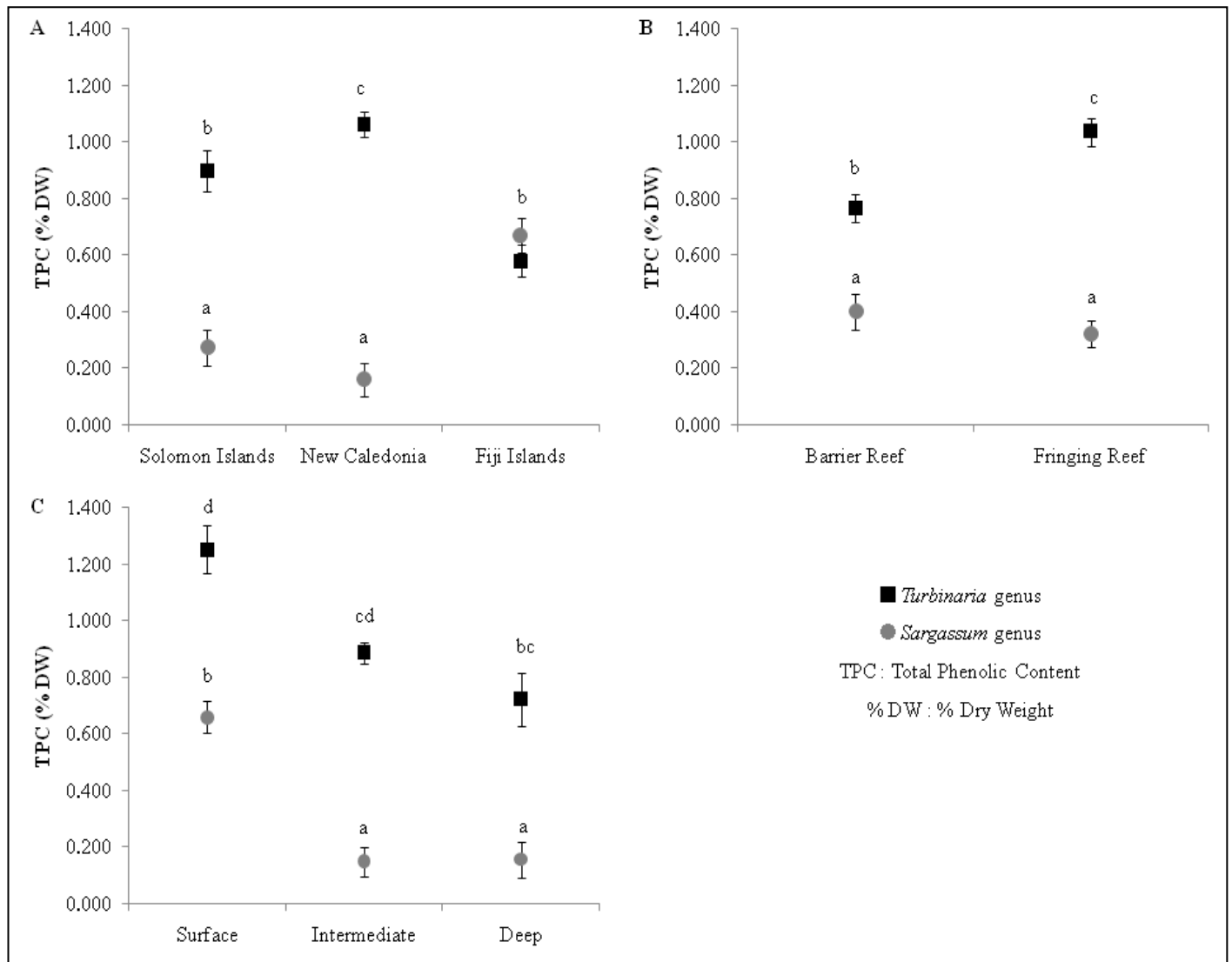


Figure 2

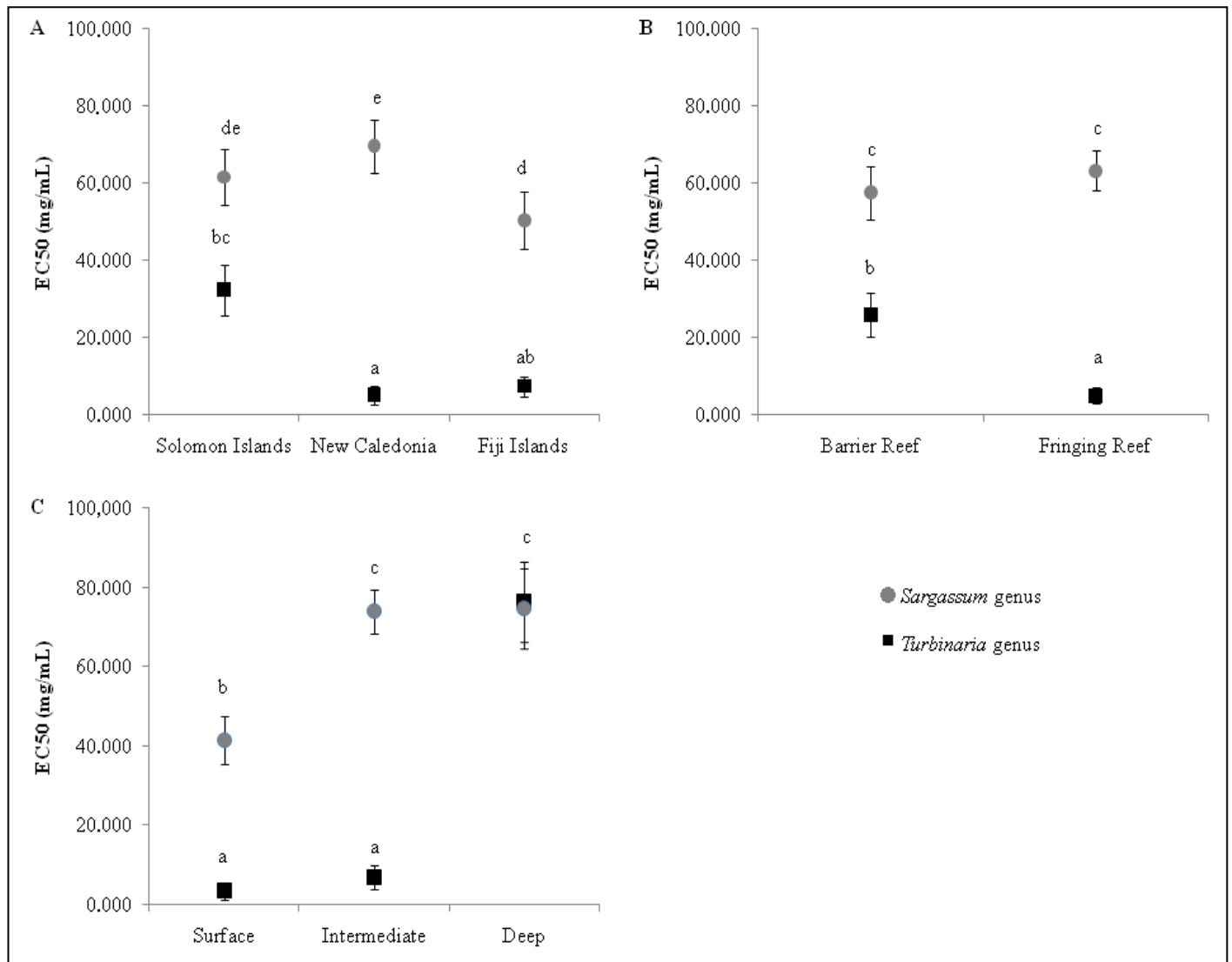


Figure 3

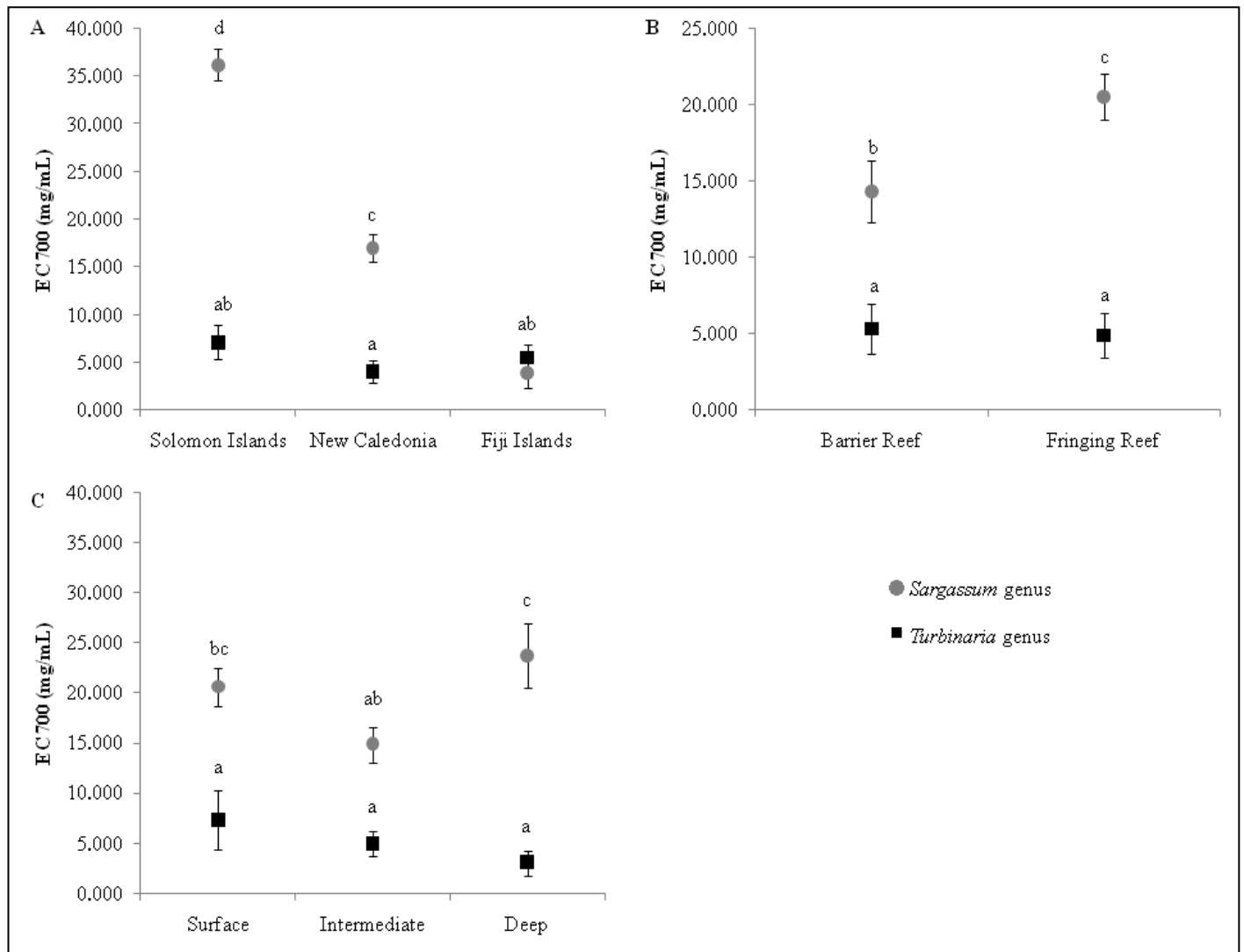


Figure 4:

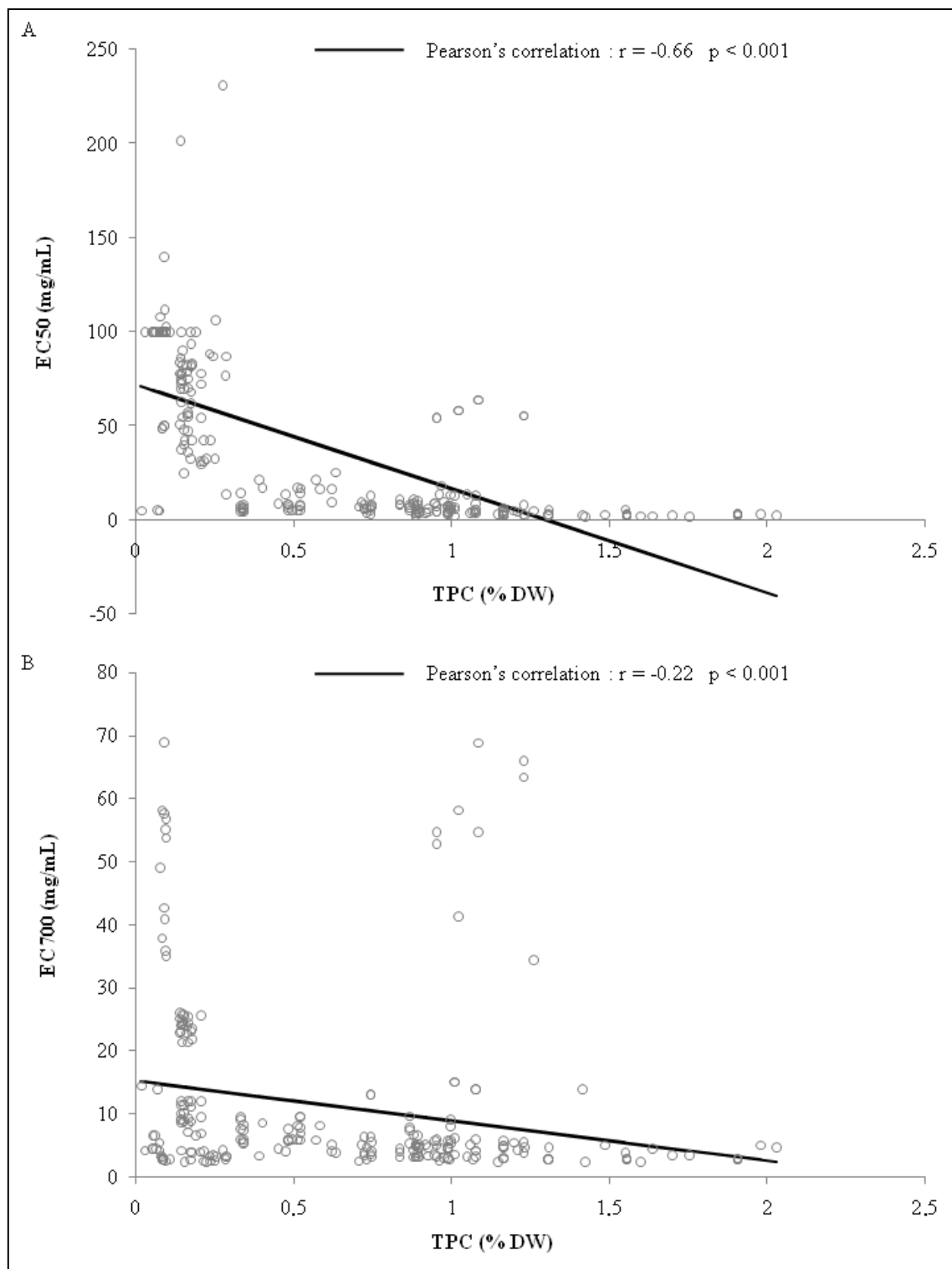
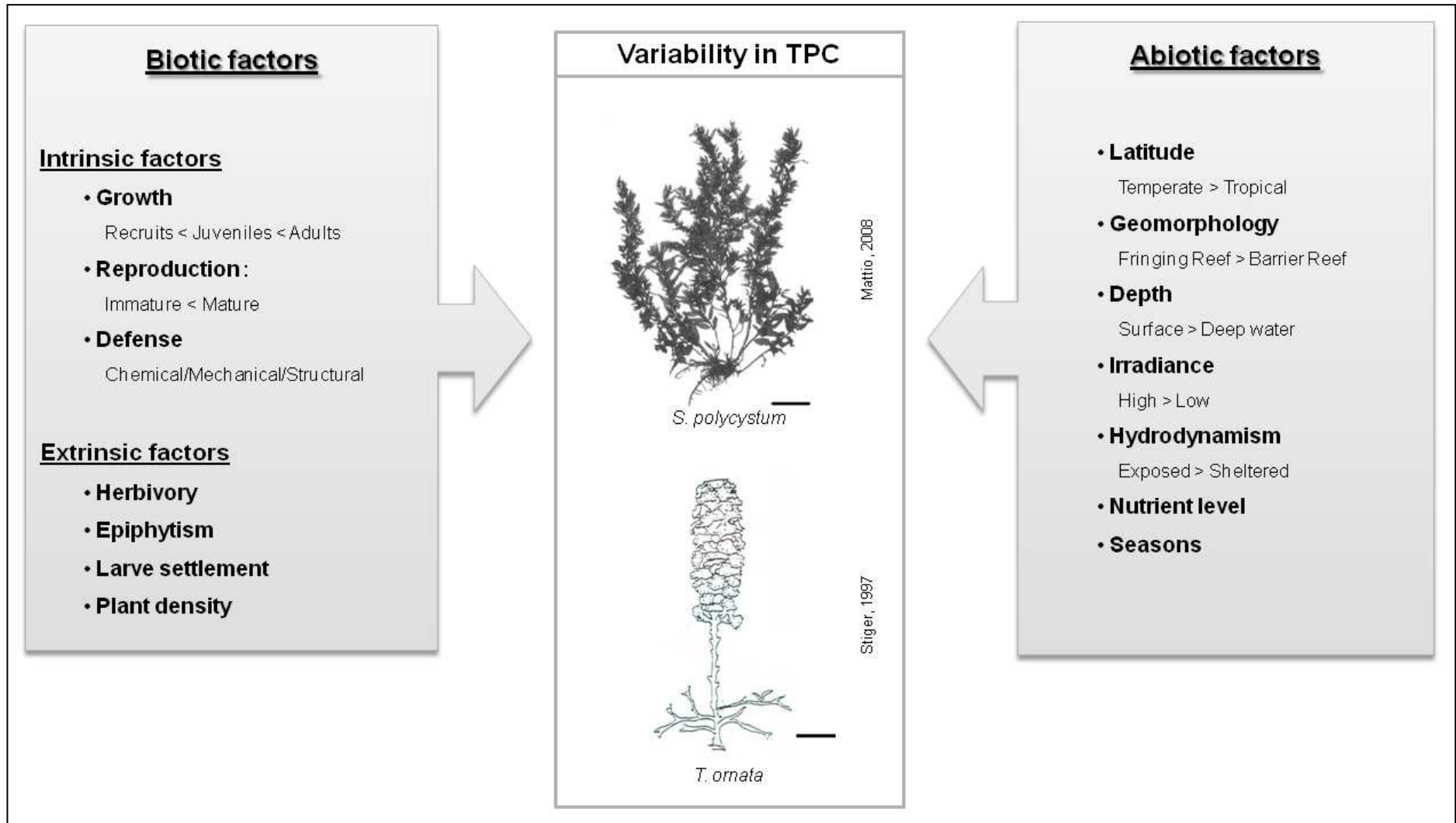


Figure 5:



2.3.2. Etude des classes de taille des composés phénoliques

Les composés phénoliques ayant une taille inférieure à 2 000 Da sont majoritaires chez les espèces de Sargassaceae en provenance du Pacifique Sud, quels que soit l'archipel, la géomorphologie et la profondeur considérée (Figure 48). Néanmoins, les classes de taille varient en fonction du genre, de l'archipel, de la profondeur et de la géomorphologie considérés.

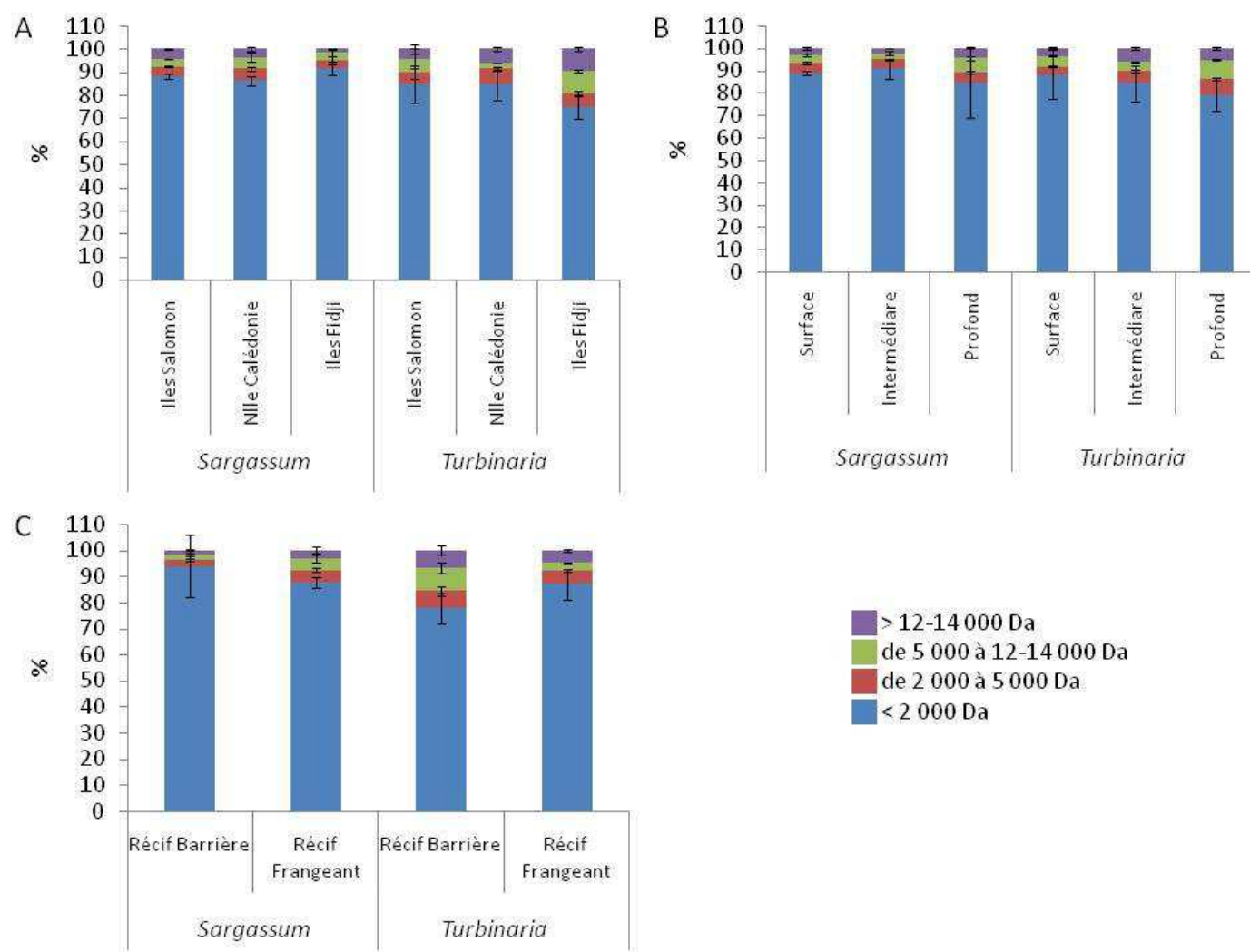


Figure 48 : Classes de taille des composés phénoliques exprimées en pourcentage pour les genres *Sargassum* et *Turbinaria* en provenance du Pacifique Sud en fonction de A : l'origine géographique des échantillons (îles Salomon, Nouvelle Calédonie ou îles Fidji), B : la profondeur du site de prélèvement (0 à 1 m : surface, 1 à 3 m : intermédiaire et 3 à 6 m : profond) et C : la géomorphologie des sites de prélèvement (Da : dalton).

Ainsi, il est intéressant d'observer que :

(1) quel que soit le genre considéré, seuls les petits composés phénoliques (taille < 2 000 Da) montrent des variations significatives (Anova $p < 0,001$, test HSD).

(2) au niveau des archipels, les composés phénoliques de petite taille (< 2 000 Da) sont significativement plus abondants aux îles Fidji que dans les autres archipels pour le genre *Sargassum* (avec $91,62 \pm 3,06$ % pour les îles Fidji, $86,12 \pm 2,05$ % pour la Nouvelle Calédonie et $88,30 \pm 1,25$ pour les îles Salomon) alors que pour le genre *Turbinaria*, c'est dans ce même archipel que sont mesurés les pourcentages (%) les plus faibles de composés phénoliques de petite taille ($74,60 \pm 4,64$ % contre $84,88 \pm 8,04$ % et $84,48 \pm 6,45$ % pour, respectivement, les îles Salomon et la Nouvelle Calédonie).

(3) Concernant les variations des classes de taille avec la profondeur, le genre *Sargassum* présente un % de composés phénoliques de petite taille significativement inférieur chez les individus qui vivent en profondeur (entre 3 et 6 m) ($84,67 \pm 1,44$ %) par rapport à ceux vivant plus en surface (entre 0 et 3 m) ($88,88 \pm 6,81$ % et $90,68 \pm 4,39$ % pour, respectivement, la surface et le niveau intermédiaire). Au contraire, dans le cas du genre *Turbinaria*, ce % ne varie pas significativement avec la profondeur (surface : $88,26 \pm 10,85$ % , intermédiaire : $84,17 \pm 7,90$ % et profondeur : $79,21 \pm 7,39$ %) (test HSD). Les teneurs en composés phénoliques de tailles comprises entre 5 000 et 12-14 000 Da augmentent avec le niveau bathymétrique, de manière significative pour le genre *Sargassum* (Profondeur : $6,44 \pm 0,94$ % , Intermédiaire : $2,82 \pm 0,95$ % , Surface : $3,52 \pm 0,56$ %), et non significative pour *Turbinaria* (Profondeur : $8,36 \pm 0,36$ % , Intermédiaire : $3,84 \pm 0,21$ % , Surface : $4,87 \pm 0,37$ %) (Anova : $p < 0,001$, test HSD).

(4) Au niveau de la géomorphologie, les individus du genre *Sargassum* vivant sur le récif-barrière montrent des % en petits composés phénoliques plus élevés ($93,79 \pm 11,93$ %) que ceux vivant sur le récif frangeant ($87,50 \pm 2,04$ %) alors que dans le cas du genre *Turbinaria*, ce sont les individus vivant sur le récif frangeant ($86,90 \pm 5,87$ %) qui montrent des % en petits composés phénoliques plus élevés que ceux vivant sur le récif-barrière ($77,67 \pm 5,85$ %) (Anova : $p < 0,001$, test HSD). Pour les autres classes de composés phénoliques, et quel que soit le genre considéré, une tendance générale est observée : *Sargassum* présente des pourcentages plus importants sur le récif frangeant que sur le récif-barrière alors que dans le cas de *Turbinaria*, c'est l'inverse qui est observé (Figure 48).

2.3.3. Variations spatiales des teneurs en fucoxanthine

Les teneurs en fucoxanthine des Sargassaceae tropicales varient en fonction du genre, de l'archipel, de la profondeur et de la géomorphologie considérée (Anova : $p < 0,001$, Figure 49).

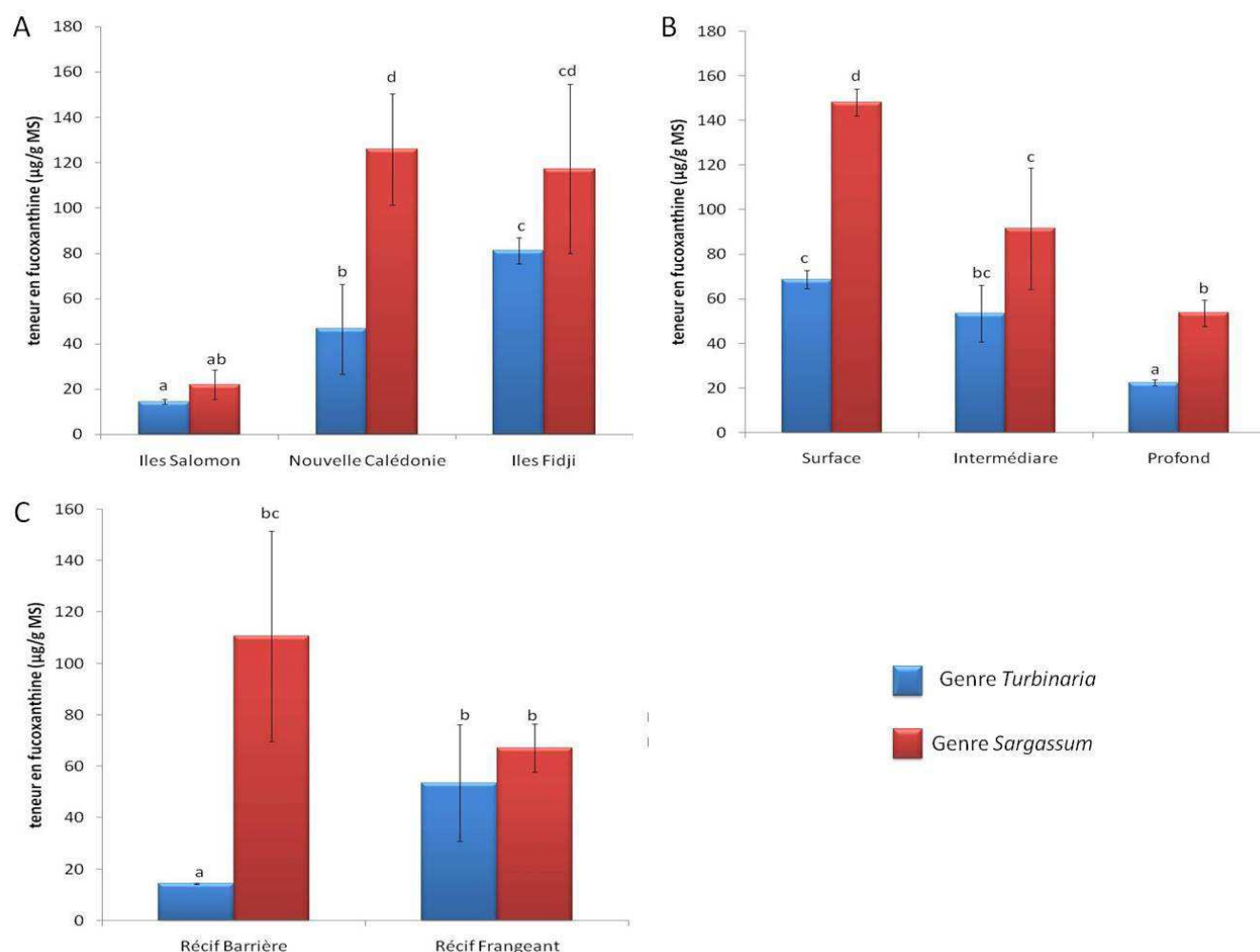


Figure 49 : Variations des teneurs en fucoxanthine de Sargassaceae tropicales en fonction du genre, de l'archipel (A), de la profondeur (B) et de la géomorphologie (C) du site de prélèvement. Surface : de 0 à 1 m, Intermédiaire : de 1 à 3 m et Profond : de 3 à 6 m de profondeur. Les lettres indiquent les différences significatives (Anova : $p < 0,001$, Test HSD). MS : matière sèche.

Quel que soit l'archipel, les teneurs en fucoxanthine du genre *Turbinaria* sont plus faibles que celles du genre *Sargassum*. Cette tendance est significative pour les échantillons prélevés aux îles Fidji. Quel que soit le genre considéré, les teneurs mesurées sur les individus collectés aux îles Salomon sont les plus faibles ($14,43 \pm 0,93$ µg/g MS pour le genre *Turbinaria* et $21,93 \pm 6,48$ µg/g MS pour le genre *Sargassum*) (Figure 49). Quelle que soit la profondeur du site considéré, les teneurs en fucoxanthine du genre *Turbinaria* sont inférieures à celles du genre *Sargassum*. Cette tendance est significative pour les individus vivant près de la

surface et ceux vivant entre 3 et 6 m de profondeur (niveau profond) (Test HSD, Figure 49). Quel que soit le genre considéré, les teneurs en fucoxanthine mesurées sur des individus vivant entre 3 et 6 m de fond (Profond) sont significativement plus faibles que celles mesurées au niveau Intermédiaire et au niveau Surface (Test HSD, Figure 49). Au niveau du récif-barrière, les teneurs en fucoxanthine du genre *Turbinaria* sont significativement plus faibles que celles du genre *Sargassum* (avec respectivement $14,43 \pm 0,32 \mu\text{g/g MS}$ et $110,58 \pm 40,88 \mu\text{g/g MS}$) alors qu'au niveau du récif frangeant, les teneurs des deux genres sont similaires avec $53,57 \pm 22,68 \mu\text{g/g MS}$ pour le genre *Turbinaria* et $67,16 \pm 9,31 \mu\text{g/g MS}$ pour le genre *Sargassum*. Il est intéressant de noter que les teneurs en fucoxanthine du genre *Turbinaria* sont significativement supérieures au niveau du récif frangeant par rapport au récif-barrière alors que pour le genre *Sargassum*, la tendance (non significative) est inversée (test HSD, Figure 49).

2.3.4. Estimation de l'activité antiradicalaire des extraits pigmentaires

Tous les extraits pigmentaires testés (ayant servis aux dosages de la fucoxanthine) présentent une activité antiradicalaire comme le montre, à titre indicatif, la Figure 50. Ainsi, quels que soit l'espèce et le site de prélèvement considérés, l'extrait pigmentaire montre une activité antiradicalaire, qui est visible par le halo blanchâtre autour du dépôt.

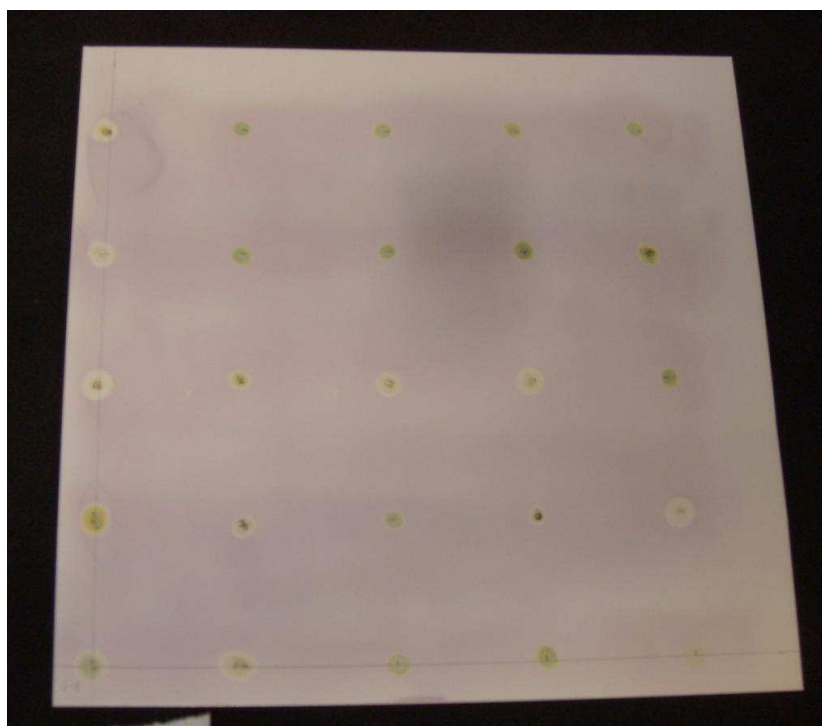


Figure 50 : Photographie des résultats d'un test DPPH sur plaque CCM permettant d'estimer l'activité antiradicalaire des extraits pigmentaires des Sargassaceae tropicales. Un extrait est considéré comme actif lorsqu'un halo blanchâtre se forme autour du dépôt (rond vert).

2.4.Comparaison du système « tempéré » et du système « tropical »

Le bilan de cette étude est le suivant :

- les teneurs en composés phénoliques sont plus importantes chez les Sargassaceae tempérées vis-à-vis des espèces vivant en milieu tropical
- que ce soit en milieu tempéré ou tropical, le pool de phlorotannins est composé en majorité de petits composés phénoliques (taille < 5 000 Da)
- les teneurs en fucoxanthine sont plus faibles chez les Sargassaceae tempérés vis-à-vis des espèces vivant en milieu tropical.

3. Discussion

3.1.Importance du conditionnement pour l'étude des composés phénoliques et leur activité antioxydante associée

Pour les espèces de Sargassaceae, la lyophilisation semble être un meilleur conditionnement que le séchage en étuve ou à l'air (Le Lann *et al.* 2008a). En effet, seule(s) la lyophilisation et /ou la congélation ne causent aucune réduction significative des teneurs en composés phénoliques ou des activités biologiques testées (antiradicalaire et antioxydante) en comparaison des résultats obtenues avec les extraits effectués sur du matériel frais. Ceci est en accord avec d'autres études déjà publiées (Franks 1998, Wong et Cheung 2001, Lim et Murtijaya 2007).

Les produits thermosensibles sont connus pour être préservés au cours de la lyophilisation. En effet, la dégradation des molécules étant assujettie à l'état liquide, l'élimination de l'eau par la lyophilisation permet la préservation de ces molécules. Néanmoins, la déstabilisation de la conformation natale des molécules induite par la lyophilisation peut mener à une diminution des bioactivités (Franks 1998). C'est pourquoi, on recommande d'extraire les composés phénoliques d'échantillons frais chaque fois que cela est possible. Cependant, selon Mueller-Harvey (2001), si toutefois ce conseil n'est pas applicable, la meilleure option reste la congélation ou la lyophilisation, ce qui est corroboré par cette étude.

La discussion concernant ces résultats est plus détaillée dans l'article publié dans *Phycological Research* (Le Lann *et al.* 2008a) et présenté au paragraphe « Optimisation du conditionnement en vue du démarrage de l'étude des composés phénoliques et de l'activité antioxydante associée » p. 99.

3.2. Ecologie chimique des 3 genres de Sargassaceae de milieu tempéré

3.2.1. Suivi spatio-temporel des populations

La densité de *Sargassum muticum* est dépendante du type de substrat et de l'hydrodynamisme. Ainsi, la densité des populations de *S. muticum* est supérieure à la Pointe du diable, site rocheux et battu, qu'à Porsmeur, site sableux et abrité (Le Lann *et al.* soumis a). Ces résultats sont cohérents avec ceux déjà obtenus sur des populations de *S. muticum* étudiées de 2003 à 2005 (Plouguerné *et al.* 2006). Une des hypothèses qui pourrait expliquer cette différence de densité en fonction du substrat et de l'hydrodynamisme est la forte influence des conditions environnementales sur la fixation des zygotes (Engelen *et al.* 2008, Monteiro *et al.* 2009). Aucune variation spatiale n'est enregistrée concernant les densités des espèces natives *Bifurcaria bifurcata* et *Cystoseira baccata*. Ceci confirme les résultats de Viejo (1997) qui n'a montré aucune variation spatiale significative du pourcentage de couverture de *C. baccata* et *B. bifurcata* en Espagne. Néanmoins, dans son étude, cet auteur n'a donné aucune information concernant l'hydrodynamisme des sites étudiés. Dans notre étude, pour chaque espèce, la densité présente des variations temporelles. Une saisonnalité des caractéristiques biologiques a déjà été décrite en région tempérée (McCourt 1984, Plouguerné *et al.* 2006, Thomsen *et al.* 2006). Les changements saisonniers du mouvement des eaux pourraient être un facteur majeur influençant la densité des populations de Sargassaceae (Plouguerné *et al.* 2006). Concernant *S. muticum*, la densité peut varier significativement au cours de périodes très courtes, à cause des événements de fort recrutement en automne et de la rapide croissance des individus au cours du printemps (Thomsen *et al.* 2006).

Tout comme la densité, la taille des individus de *Sargassum muticum* est dépendante du substrat et de l'hydrodynamisme. En effet, les individus vivant à Porsmeur, site sableux et abrité, sont plus grands que ceux vivant à la Pointe du Diable, site rocheux et battu. Ceci n'est pas en accord avec les résultats de Plouguerné *et al.* (2006) et Engelen *et al.* (2005). L'observation des individus au sein des deux sites, nous a amené à supposer que les latérales des individus vivant à la Pointe du Diable étaient certainement déchirées par les vagues et/ou la houle lorsqu'elles atteignaient une taille critique. Cette supposition, déjà proposée par Gaylord *et al.* (1994) et Viejo *et al.* (1995), semble être la meilleure explication, d'autant plus que les pieds

de *S. muticum* vivant à la Pointe du Diable montrent plus de latérales endommagées et déchirées que ceux de Porsmeur (Observations personnelles) Concernant *Cystoseira baccata*, les variations saisonnières de la taille sont fonction du site considéré. La croissance de l'algue semble donc être dépendante des conditions environnementales tels que le substrat et/ou l'hydrodynamisme. Néanmoins, dans les deux sites d'étude, la période de croissance de *C. baccata*, correspond au développement de nouvelles touffes aux apex des latérales. *Cystoseira nodicaulis* montre également des périodes de croissance correspondant au développement de nouvelles branches en apex (Arenas *et al.* 1995). En ce qui concerne *Bifurcaria bifurcata*, la taille des individus ne varie pas significativement en fonction du site. Concernant les variations temporelles une période d'étude plus longue permettrait d'apporter une meilleure compréhension concernant l'évolution saisonnière de la taille des individus de *B. bifurcata*. Les plus faibles tailles mesurées pour les individus de *S. muticum* à la Pointe du Diable (site exposé) vis-à-vis des tailles mesurées à Porsmeur (site abrité) reflèterait une flexibilité phénotypique par rapport à l'environnement (Viejo *et al.* 1995). Ainsi, *S. muticum* présenterait une **plasticité phénotypique** contrairement aux deux espèces natives *C. baccata* et *B. bifurcata*.

Les périodes de reproduction sont différentes pour les trois espèces. Les deux populations de *Sargassum muticum* étudiées sont matures de la fin du printemps au début de l'automne. Cette phénologie reproductrice est semblable à celle des autres populations de *S. muticum* étudiées le long des côtes européennes (Critchley *et al.* 1990 pour synthèse avant 1990, Arenas *et al.* 1995, Plouguerné *et al.* 2006). *Cystoseira baccata* et *Bifurcaria bifurcata* sont matures toute l'année, sauf au cours d'une période de repos ou de dormance, du printemps à l'été pour *C. baccata* et pendant l'été pour *B. bifurcata*. La période reproductrice de *B. bifurcata* observée au cours de cette étude est semblable à celle observée en Irlande (Hardy et Moss 1979).

Les teneurs en composés phénoliques varient en fonction de la saison chez les trois espèces étudiées, avec des teneurs maximales atteintes en été et au cours des périodes de reproduction (Le Lann et Stiger-Pouvreau, in review).

L'augmentation des teneurs en composés phénoliques à la fin du printemps conforte l'hypothèse du rôle photoprotecteur des phlorotannins déjà mis en évidence par de nombreux auteurs (Pavia *et al.* 1997, Henry et Van Alstyne 2004, Fairhead *et al.* 2006, Abdala-Díaz *et al.* 2006, Plouguerné *et al.* 2006). Les fortes teneurs en polyphénols observées durant les périodes de reproduction, observées chez les 3 espèces étudiées, semblent indiquer leur rôle dans la protection des réceptacles et des zygotes en cours d'incubation contre, par exemple, les herbivores. En effet, les composés phénoliques sont connus pour avoir une action repoussante vis-à-vis des brouteurs (Amsler et Fairhead 2006 pour synthèse).

La discussion concernant ces résultats est plus détaillée dans le manuscrit en revue dans le journal *Marine Biology* et présenté au paragraphe « Suivi écologique et écologie chimique de Sargassaceae tempérées » p. 108.

3.2.2. Molécules de défense

Deux types de molécules de défense ont été étudiées : les composés phénoliques et la fucoxanthine.

3.2.2.1. Etude des classes de taille des composés phénoliques

Cette étude a montré que la majorité des composés phénoliques étaient de faible poids moléculaire. Ces résultats diffèrent de ceux obtenus pour différents espèces de Fucales et de Laminariales des zones tempérées (Connan 2004). Dans l'étude de Connan (2004), ses espèces de Fucales tempérées présentaient une majorité de composés phénoliques de grandes tailles, supérieures à 12-14 000 Da. De plus, au moins 16 % des composés phénoliques de *B. bifurcata* présentaient des tailles supérieures à 12-14 000 Da. Dans notre étude concernant *B. bifurcata*, les composés phénoliques de grandes tailles (supérieures à 12-14 000 Da) représentent moins de 13% du pool total de phlorotannins quels que soient la saison et le site considérés.

Notre étude a également montré une variabilité spécifique, spatiale et saisonnière dans la nature du pool de composés phénoliques. Ces résultats sont en accord avec ceux présentés par Connan (2004). En effet, cet auteur montrait alors que les teneurs en composés phénoliques de grande taille (supérieurs à 12-14 000 Da) variaient en proportion et en teneur selon le mois et l'espèce étudiée. Ainsi, la nature du pool de composés phénoliques semble être fonction des conditions environnementales. De plus, ces résultats montrent que la nature du pool de composés phénoliques de *Bifurcaria bifurcata* et *Cystoseira baccata* diffèrent entre l'été et l'hiver. Ainsi, les composés phénoliques synthétisés en été et jouant probablement un rôle dans la photoprotection des algues, seraient de nature différente de ceux synthétisés en hiver, lorsque les deux espèces natives sont en reproduction (protection des réceptacles).

Les résultats concernant les relations entre composés phénoliques et activité antiradicalaire présentés suggéraient que les polyphénols produits par les espèces de Sargassaceae étudiées présentaient des différences qualitatives. Cette hypothèse semble se confirmer par l'étude du pool de composés phénoliques en fonction des classes de taille. En effet, la nature de ce pool varie en fonction de l'espèce étudiée.

Cette étude est la première à montrer des variations inter- et intraspécifiques ainsi que spatio-temporelles dans la nature du pool de composés phénoliques de *Sargassum muticum* et de *Cystoseira*

baccata. A notre connaissance, c'est également la première fois qu'est étudiée la nature du pool de phlorotannins d'espèces de Sargassaceae en fonction de différentes classes de taille.

3.2.2.2. Variabilité de la fucoxanthine

Cette étude est, à notre connaissance, la première à relater des variations spatio-temporelles des teneurs en fucoxanthine chez des espèces de Sargassaceae des côtes bretonnes.

Une seule étude relate des teneurs en fucoxanthine chez différentes espèces de Phaeophyceae appartenant aux ordres des Scytosiphonales et des Laminariales, originaires du Japon (Mori *et al.* 2004). Les teneurs relatées dans cette étude sont comprises entre 0,241 mg/g MS (chez les jeunes thalles de *Scytosiphon lomentaria*) et 2,671 mg/g MS (chez le gamétophyte mâle d'*Undaria pinatifida*). Ces teneurs sont supérieures à celles trouvées chez les Sargassaceae des côtes bretonnes. Ces différences peuvent s'expliquer d'une part, par les différentes familles étudiées et d'autre part, par la méthode de dosage utilisée. En effet, nous avons dosé la fucoxanthine par HPLC alors que Mori *et al.* (2004) ont déterminé les teneurs en fucoxanthine par colorimétrie (spectrométrie UV).

Les teneurs en fucoxanthine varient en fonction du site, de la saison et de l'espèce considérée. Pour *Sargassum muticum* et *Cystoseira baccata*, les teneurs en fucoxanthine sont plus élevées en zone abritée et sableuse (Porsmeur) qu'en zone exposée et rocheuse (la Pointe du Diable). Pour *Bifurcaria bifurcata* l'inverse est observé. Concernant les variations saisonnières de la fucoxanthine, chez *C. baccata*, les plus fortes teneurs en fucoxanthine sont mesurées au cours de l'été et de l'automne, ce qui concorde avec les plus fortes luminosités. C'est également une période de croissance et de maturation des réceptacles du thalle, en effet, *C. baccata* est mature à la fin en hiver. Chez *S. muticum*, la fucoxanthine est synthétisée en grande quantité au printemps, avant le maximum d'intensité lumineuse et lors de la forte croissance des latérales et de la maturation des réceptacles (les individus de *S. muticum* sont matures et de grande taille à la fin du printemps et au cours de l'été). Pour ces deux espèces, les variations saisonnières des teneurs en fucoxanthine suivent les mêmes tendances entre les deux sites. Au contraire, l'évolution saisonnière des teneurs en fucoxanthine de *B. bifurcata* est plus difficile à interpréter car les teneurs montrent une forte variation spatiale.

L'augmentation importante des teneurs en fucoxanthine au printemps 2008 pourraient s'expliquer par une intensité lumineuse supérieure durant l'hiver 2008 ($260,50 \pm 85,71 \mu\text{einstein/m}^2/\text{s}$) que durant l'hiver 2007 ($157,14 \pm 73,67 \mu\text{einstein/m}^2/\text{s}$). Néanmoins, cette augmentation des teneurs en fucoxanthine ne se retrouve pas chez *C. baccata* de Porsmeur.

Tous les extraits pigmentaires montrent une activité antiradicalaire, quels que soit l'espèce, le site de récolte et la saison considérés. Ceci est cohérent avec la littérature : en effet, la fucoxanthine est connue pour présenter des activités antioxydantes (Yan *et al.* 1999, Heo et Jeon 2009) et antiradicalaire (Nomura *et al.* 1997).

Malgré l'activité antiradicalaire des extraits pigmentaires démontrée par le test DPPH sur plaque CCM et une étude récente sur l'effet protecteur de la fucoxanthine contre un stress induit par les radiations UV (Heo et Jeon 2009), le rôle photoprotecteur *in vivo* de cette molécule n'est pas réellement confirmé par nos résultats. En effet, les teneurs en fucoxanthine ne sont corrélées avec l'intensité lumineuse que pour une seule des trois espèces étudiées : l'espèce introduite *S. muticum*. De plus, l'influence des conditions environnementales sur la synthèse de fucoxanthine varie en fonction de l'espèce considérée.

3.3. Ecologie chimique de 2 genres de Sargassaceae en milieu tropical

3.3.1. Suivi spatial des populations

Les teneurs en composés phénoliques mesurées au cours de cette étude sont en accord avec de précédents travaux concernant des espèces tropicales et subtropicales du genre *Turbinaria* et *Sargassum* (Stiger *et al.* 2004, Zubia *et al.* 2007, Zubia *et al.* 2008). Cette étude a également montré la variabilité des teneurs en composés phénoliques non seulement en fonctions du genre et/ou de la localisation géographique, décrite par plusieurs auteurs (Steinberg 1986, Van alstyne et Paul 1990, Stiger *et al.* 2004, Kesava Rao et Untawale 1991, Targett *et al.* 1992), mais aussi en fonction du niveau bathymétrique et de la géomorphologie du récif (Le lann *et al.* in review). L'influence du niveau bathymétrique sur les teneurs en composés phénoliques peut être reliée à l'impact des radiations UV sur la synthèse de composés phénoliques au sein des algues brunes. En effet, d'après certains auteurs (Pavia et Brock 2000, Pavia et Toth 2000, Peckol *et al.* 1996, Henry and Van Alstyne 2004, Fairhead *et al.* 2006), il existerait une relation entre le niveau d'irradiation et le métabolisme secondaire. L'influence de la géomorphologie du récif sur les teneurs en polyphénols des Sargassaceae, est en accord avec des travaux précédents sur la défense chimique de Sargassaceae en Polynésie française (Stiger *et al.* 2004). Ces auteurs expliquaient les différences spatiales des teneurs observées par une pression de broutage plus importante au niveau du récif frangeant, résultat que nous obtenons ici, avec les plus fortes teneurs mesurées pour le genre *Turbinaria* collecté au récif frangeant.

Les différences de teneurs en composés phénoliques observées entre les deux genres *Sargassum* et *Turbinaria* sont en accord avec les résultats de Stiger *et al.* (2004). Pour ces auteurs, les différences

observées dans les teneurs en composés phénoliques entre *T. ornata* et *S. pacificum*, anciennement connue sous le nom de *S. mangarevens* (Mattoo 2008) proviendraient des différences de morphologies qui existent entre ces deux genres. Ces deux espèces libèrent des zygotes qui se fixent à moins d'1 m des thalles parentaux (Stiger et Payri 1999b). Ainsi, *Turbinaria ornata*, qui possède un thalle rigide et dressé, mettrait en place une défense chimique, via la synthèse de composés phénoliques, pour protéger ses recrues alors que *Sargassum pacificum*, avec son thalle souple et flexible, protégerait ses recrues par une action mécanique de ses latérales (Stiger *et al.* 2004). Aucune des espèces étudiées n'a montré de fortes activités antiradicalaires et/ou antioxydantes. Ce qui est en contradiction avec les précédents travaux sur les Sargassaceae des régions tropicales et subtropicales (Anggadiredja *et al.* 1997, Santoso *et al.* 2004, Zubia *et al.* 2007, Zubia *et al.* 2008). Néanmoins, il est intéressant de noter les corrélations significatives que nous avons pu établir entre les activités antiradicalaires et/ou antioxydantes et les teneurs en polyphénols (Le Lann *et al.* in review). Ces observations sont en accord avec de précédentes études sur des Fucales (Velioglu *et al.* 1998, Jimenez-Escrig *et al.* 2001, Connan *et al.* 2006, Connan *et al.* 2007, Zubia *et al.* 2007, Le Lann *et al.* 2008a, Zubia *et al.* 2008).

Ainsi, dans cette étude concernant les Sargassaceae du Pacifique Sud, le contenu en composés phénoliques totaux et les activités antiradicalaire et antioxydante varient avec le genre, le secteur géographique, la zone géomorphologique et le niveau bathymétrique. Les corrélations significatives déterminées entre les teneurs en composés phénoliques et les activités antiradicalaire et antioxydante suggèrent que ces variations résulteraient d'une production qualitative et quantitative de phlorotannins, pour chaque espèce, en réponse aux paramètres environnementaux.

3.3.2. Molécules de défense

3.3.2.1. Classes de taille des composés phénoliques

D'après la littérature, ce travail est le premier à mettre en évidence des variations spatiales (géographique, bathymétrique et géomorphologique) de la composition du pool de composés phénoliques chez deux genres de Sargassaceae tropicales, au travers de variations des proportions de différentes classes de taille de composés phénoliques.

Le pool de composés phénoliques des genres *Turbinaria* et *Sargassum* des îles du Pacifique Sud, est composé majoritairement d'oligophénols (petits composés phénoliques de faibles poids moléculaires, < 2 000 Da). Ces résultats rejoignent ceux préalablement présentés dans ce travail au sujet des

Sargassaceae tempérées mais différent de ceux obtenues par Connan (2004) pour plusieurs espèces de Fucales des côtes bretonnes.

Comme pour le milieu tempéré, la nature du pool de composés phénoliques varie en fonction des conditions de l'environnement et ceci, quel que soit le genre considéré.

La nature du pool varie également avec le niveau bathymétrique. Pour les deux genres étudiés, une diminution des teneurs en petits composés phénoliques ($< 2\,000$ Da) est observée en relation avec une augmentation des teneurs en polyphénols de tailles comprises entre 5 000 et 12-14 000 Da, les petits composés phénoliques auraient alors une action photoprotectrice plus importante par rapport aux phlorotannins de grandes tailles.

Cette différence de la composition du pool de composés phénoliques en fonction de la quantité et/ou de la qualité des radiations solaires reçues est une des hypothèses proposées par Connan (2004) pour expliquer les teneurs en phlorotannins plus faibles chez les Fucales du haut et du bas de l'étage médiolittoral par rapport à celles mesurées au milieu de l'estran.

La géomorphologie influe également la nature du pool de composés phénoliques, mais de façon différente en fonction du genre considéré. Ainsi ces résultats suggèrent que la composition du pool de composés phénoliques synthétisés par les algues varie en fonction du genre considéré et des conditions environnementales. Ceci appuie les résultats discutés dans le paragraphe précédent « Suivi spatial des populations ».

3.3.2.2. La fucoxanthine

Cette étude est la première à notre connaissance à mettre en évidence des variations spatiales (géographique, bathymétrique et géomorphologique) des teneurs en fucoxanthine chez deux genres de Sargassaceae du Pacifique Sud.

La diminution des teneurs en fucoxanthine chez les deux genres étudiés (*Turbinaria* et *Sargassum*) avec l'augmentation de la profondeur n'est pas en accord avec la littérature. En effet, lors d'expérimentations réalisées *in situ* il a été mis en évidence que les algues brunes augmentaient leurs proportions en fucoxanthine et en chlorophylle *c* avec la profondeur, c'est-à-dire en cas de faible lumière (Lüning 1990, De Reviers 2003a). Ainsi, les thalles d'*Ascophyllum nodosum* ayant séjournés une semaine à 4 m de profondeur présentent des teneurs en fucoxanthine 1,5 fois plus élevées que les thalles ayant séjournés une semaine à la surface (0 m). L'augmentation est encore plus élevée chez *Fucus vesiculosus* : de l'ordre de 1,9 fois (Lüning

1990). Il se pourrait donc que chez les Sargassaceae de milieu tropical, la fucoxanthine joue non seulement un rôle de collecte d'énergie, mais aussi un rôle photoprotecteur.

Les variations des teneurs en fucoxanthine avec la géomorphologie du récif, variations qui ne suivent pas la même tendance chez les deux genres considérés, appuient l'hypothèse d'une synthèse de fucoxanthine en fonction des facteurs biotiques et abiotiques.

La fucoxanthine appartient aux systèmes collecteurs d'électrons (De Reviers 2003a, Caron *et al.* 2001). Elle est donc impliquée dans la photosynthèse et la collecte d'énergie. Ainsi, une des hypothèses pouvant expliquer les différences observées dans les teneurs en fucoxanthine entre les genres *Turbinaria* et *Sargassum* mais aussi pouvant expliquer les variations spatiales de ces teneurs serait une demande plus forte d'énergie induisant une augmentation de la synthèse en fucoxanthine.

De plus, comme en milieu tempéré, tous les extraits pigmentaires montrent une activité antiradicalaire, quels que soit l'espèce et le site de récolte considérés. Ceci est cohérent avec la littérature, puisque la fucoxanthine est connue pour montrer des activités antioxydantes (Yan *et al.* 1999, Heo et Jeon 2009) et antiradicalaire (Nomura *et al.* 1997).

3.4.Comparaison du système « tempéré » et du système « tropical »

La différence des teneurs en composés phénoliques entre les algues de milieu tropical et celles de milieu tempéré est en accord avec la littérature de travaux menés en milieu tempéré (Steinberg 1986, Pereira et Yoneshigue-Valentin 1999, Zubia 2003). Ces composés ont très probablement plusieurs rôles biologiques différents (Amsler et Fairhead 2006), dont certains, comme la lutte contre les herbivores, restent ambigus. En effet, certains auteurs démontrent que les composés phénoliques chez les Algues brunes tropicales sont des composés de défense contre le broutage (Van Alstyne 1988, Yates et Peckol 1993, Pavia *et al.* 1997, Stiger *et al.* 2004) et qu'ils seraient efficace à forte concentration (Van Alstyne et Paul 1990, Pereira et Yoneshigue-Valentin 1999) alors que ce rôle est controversé par d'autres auteurs (Steinberg 1986, Steinberg *et al.* 1991). Ainsi, il est difficile d'émettre une ou plusieurs hypothèses expliquant cette différence de teneurs. Cependant cela appuie l'hypothèse de Jormalainen et Honkanen (2004) qui suggéraient l'existence de variations génétiques et d'une plasticité phénotypique dans la synthèse de composés phénoliques.

Les algues en provenance des deux milieux présentent un pool de phlorotannins composé majoritairement de petits composés phénoliques. Néanmoins, nous n'avons pas isolé de composés et nous pouvons donc nous demander s'il n'existerait pas une différence qualitative en fonction des genres/espèces dans la synthèse de ces oligophénols.

Les teneurs en fucoxanthine plus faibles chez les Sargassaceae vivant en milieu tempéré que chez celles vivant en milieu tropical peuvent être expliquées par le rôle photoprotecteur de cette molécule. En effet, les intensités lumineuses et les radiations solaires dans le Pacifique Sud sont plus fortes que sur la pointe Bretagne.

Il ressort de cette étude que les Sargassaceae tropicales et tempérées ne mettent pas en place les mêmes stratégies de défense vis-à-vis de leur environnement. Ceci n'est pas une surprise puisque ces algues vivent dans des milieux très différents, il est donc très probable que ces espèces se soient adaptées aux conditions particulières de leur environnement au fil de l'évolution.

Conclusion- Synthèse

Dans ce Chapitre, nous avons montré que les composés phénoliques des Sargassaceae variaient quantitativement et qualitativement en fonction du milieu (tempéré versus tropical), de l'hydrodynamisme (abrité versus battu), du niveau bathymétrique, de la géomorphologie, du site, du genre et de l'espèce.

La fucoxanthine a également été étudiée. La synthèse de ce pigment varie en fonction de l'environnement (milieu, hydrodynamisme, profondeur dans la colonne d'eau), du genre et de l'espèce considérés. Ainsi, le travail présenté dans ce Chapitre II met en évidence l'existence d'une écologie chimique spécifique au sein de la famille des Sargassaceae.

Ces stratégies de défense chimique, différentes en fonction des espèces, peuvent être interprétées comme le reflet de la **chimiodiversité de ces espèces**. En effet, certaines espèces de macroalgues, et en particulier les espèces du genre *Cystoseira* sont connues pour présenter une forte chimiodiversité, qui est utilisée par certains auteurs comme un outil taxonomique pour classer les espèces (Kornprobst 2005). La recherche de composés chimiques, potentiellement marqueurs d'espèces de Sargassaceae est un domaine qui nous a intéressé. Ces travaux font l'objet d'une étude chimiotaxonomique au sein des Sargassaceae qui est présentée au Chapitre III.

CHAPITRE III : CHIMIOTAXONOMIE

Introduction

Les êtres vivants se développent grâce à un ensemble complexe de réactions biochimiques nommées globalement métabolisme². On distingue les réactions qui permettent la synthèse et l'utilisation des substances essentielles à la reproduction et à la survie de l'organisme (**métabolisme primaire**) de celles qui permettent la synthèse et l'utilisation de composés qui ne sont pas essentiels au maintien de la vie, mais qui sont les vecteurs de la communication chimique de ces organismes (**métabolisme secondaire**). Le métabolisme primaire est considéré comme commun à tous les organismes, il traduit l'unité du monde vivant alors que les métabolismes secondaires sont caractérisés par une grande diversité et une grande spécificité (Kornprobst 2005).

Ainsi, les êtres vivants et en particulier les espèces végétales marines synthétisent de nombreuses molécules chimiques en réponse aux stimuli de leur environnement. Ces molécules varient en fonction des genres et des espèces considérés. Les métabolites secondaires illustrent donc la diversité du monde des êtres vivants. En effet, il existe un très grand nombre de composés, de l'ordre de 10 000, qui appartiennent à toutes les familles chimiques (Kornprobst 2005).

Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressées à la diversité chimique ou **chimiodiversité** des Sargassaceae. Pour cela, nous avons étudié la chimiotaxonomie des Sargassaceae sur deux niveaux de compréhension :

- au niveau des espèces appartenant à un même genre que nous avons défini comme la **chimiotaxonomie interpécifique**,
- au niveau d'une même espèce, définie comme la **chimiotaxonomie intraspécifique**.

La chimiotaxonomie est le classement du vivant qui s'appuie sur la chimiodiversité. En effet, certains métabolites exclusifs peuvent avoir une signification phylogénique. Pour étudier ces différents niveaux de chimiotaxonomie, nous avons choisi de travailler sur des taxons permettant la mise en évidence de **chimiomarqueurs**.

Une étude préliminaire mettant en évidence la présence de chimiomarqueurs spécifiques au sein du genre *Turbinaria* s'est déroulée au cours de mon stage de Master 2 (Le Lann 2006). Au niveau de la

² métabolisme : ensemble des réactions biochimiques d'un organisme, composé des voies cataboliques et anaboliques d'après Campbell NA (1995).

chimiodiversité interspécifique, nous avons donc choisi le genre *Turbinaria*. Ce genre présentait de nombreux avantages. D'une part, les espèces appartenant à ce genre étaient disponibles en quantité suffisante. D'autre part, contrairement aux espèces du genre *Sargassum*, au moins deux espèces du genre *Turbinaria* présentaient une large répartition géographique au sein du Pacifique Sud (cf. Chapitre I, Figure 34, p.74). De plus, les deux espèces, *T. ornata* et *T. conoides*, ont la particularité d'être des espèces sœurs difficilement distinguables par leur seule morphologie (Rohfritsch 2006), il y avait donc un défi à relever : pouvait-on distinguer ces deux espèces par l'isolement de chimiomarqueurs ?

Concernant l'étude de chimiodiversité intraspécifique, notre choix s'est porté sur l'espèce bretonne *Birfurcaria bifurcata* car elle est facilement et régulièrement accessible à marée basse et révèle une large répartition géographique à l'échelle de la Bretagne. De plus, cette espèce montre également l'avantage d'être présente, en quantité suffisante dans des milieux variés (rocheux, sableux, battu, abrité...). De plus, d'après la littérature (Valls *et al.* 1986, Valls *et al.* 1995, Culioli *et al.* 2004, El Hattab *et al.* 2008 et références ci-incluses), *B. bifurcata*, présente au moins trois variétés chimiques le long des côtes atlantiques, dont deux sont présentes en Bretagne. En étudiant la chimiodiversité intraspécifique de cette espèce, nous nous sommes demandé si ces variétés pouvaient être rattachées à un écotype particulier.

N.B. : Pour mener à bien ces études concernant la chimiodiversité des Sargassaceae, nous avons utilisé diverses techniques de chimie analytique, à savoir des techniques de spectroscopie et de chromatographie (Résonance Magnétique Nucléaire, Chromatographie sur Couche Mince, Chromatographie Liquide couplée ou non à la Spectroscopie de Masse, Chromatographie Gazeuse couplée à la Spectroscopie de Masse). Afin de ne pas alourdir le texte, le principe de chacune de ces techniques est présenté en annexe III-1.

1. Distinction interspécifique par isolement de chimiomarqueurs au sein du genre *Turbinaria*

1.1. Etat de l'art et problématique

Turbinaria ornata et *T. conoides* sont deux espèces très proches d'un point de vue morphologique. Néanmoins, elles forment deux clades bien distincts comme l'ont montré Rohfritsch *et al.* (2007). En combinant les résultats obtenus par l'utilisation de différents marqueurs moléculaires (chloroplastique, mitochondriale et nucléaire), ces auteurs ont montré que ces deux espèces formaient deux groupes monophylétiques distincts et phylogénétiquement proches (Figure 51).

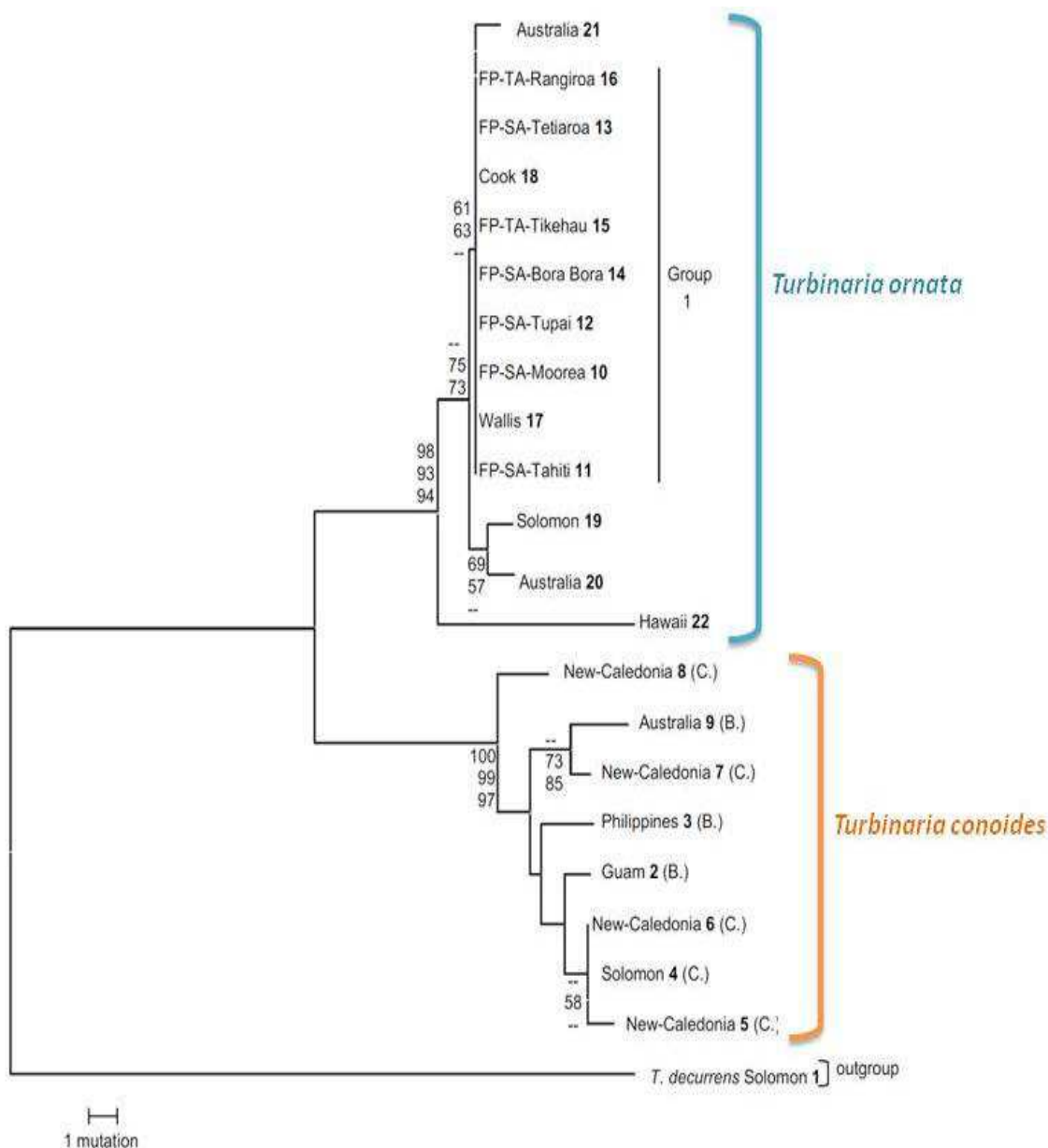


Figure 51 : Arbre phylogénétique construit avec la méthode du plus proche voisin à partir des matrices de distances Kimura à deux paramètres des séquences concaténées *Rubisco*, *trnWetnI*, *TufA* et *ITS-2*. Les valeurs numériques des nœuds indiquent les scores de bootstraps supérieurs à 50%. Outgroup : témoin extérieur. FP, Polynésie Française, SA, Archipel de la Société, TA, Archipel des Tuamotu (d'après Rohfritsch *et al.* 2007).

La distinction entre *Turbinaria ornata* et *T. conoides*, en se basant seulement sur leur morphologie est complexe. En effet, de fréquentes erreurs de taxonomie surviennent lors de l'examen de ces 2 espèces sœurs (Rohfritsch 2006). *Turbinaria ornata* et *T. conoides* se distinguent par la couronne de dents intramarginales au niveau des pleuridies, comme ceci a été présenté au Chapitre I (Figure 36). Néanmoins, il subsiste des ambiguïtés dans le cas de formes atypiques de *T. ornata* et de *T. conoides* présentant peu ou pas de dents

intramarginales (Rohfritsch 2006). La frontière entre ces deux espèces n'est donc pas facile à établir par le seul examen de leur morphologie. L'outil moléculaire peut répondre à ce défi, néanmoins, cet outil est long à mettre en œuvre (l'extraction des acides nucléiques des algues marines est délicate, ainsi que la mise au point des techniques d'isolement des marqueurs moléculaires) et cet outil est également onéreux. C'est pourquoi il était intéressant de **développer une démarche simple et rapide** permettant de distinguer les deux espèces de *Turbinaria*.

1.2. Matériels et méthodes

1.2.1. Démarche expérimentale

La Figure 52 illustre de façon schématique les principales étapes qui nous ont permis d'isoler des chimiomarqueurs au sein du genre *Turbinaria*.

Tout d'abord, nous avons mis au point une technique permettant, de façon efficace, de distinguer ces deux espèces. Parmi les techniques novatrices, nous avons sélectionné la **RMN *in vivo* ou ^1H RMN HR-MAS**. Cette technique est initialement utilisée pour donner une vision des métabolites présents dans un échantillon donné. Nous avons détourné l'objectif principal de cette technique en l'utilisant pour obtenir une empreinte chimique de chaque espèce ; chaque empreinte étant ensuite comparée à une autre.

Suite aux résultats obtenus en RMN *in vivo*, dans le but d'isoler les molécules discriminantes, nous avons extrait les lipides totaux des échantillons de *Turbinaria*, en suivant deux démarches distinctes. Enfin, les extraits lipidiques ont été analysés en ^1H RMN afin de s'assurer de la présence de composés discriminants au sein de ces extraits.

Au cours de la première démarche (nommée démarche A, Figure 52) nous avons tout d'abord analysé en Chromatographie sur Couches Minces (CCM) les extraits lipidiques. Suite aux résultats obtenus, nous avons fractionné les extraits bruts en fonction des classes de taille des lipides. Pour chaque extrait étudié nous avons obtenu 3 fractions : les **lipides neutres** (notée LN), les **galactolipides et dérivés** (notée GL) et les **phospholipides et dérivés** (notée PL). La fraction LN n'étant pas suffisamment pure, elle a subi un fractionnement supplémentaire. Afin de s'assurer de la bonne séparation et de confirmer ou non la présence de composés discriminants au sein des différentes fractions obtenues, nous avons analysé ces fractions en CCM et en RMN des solutions.

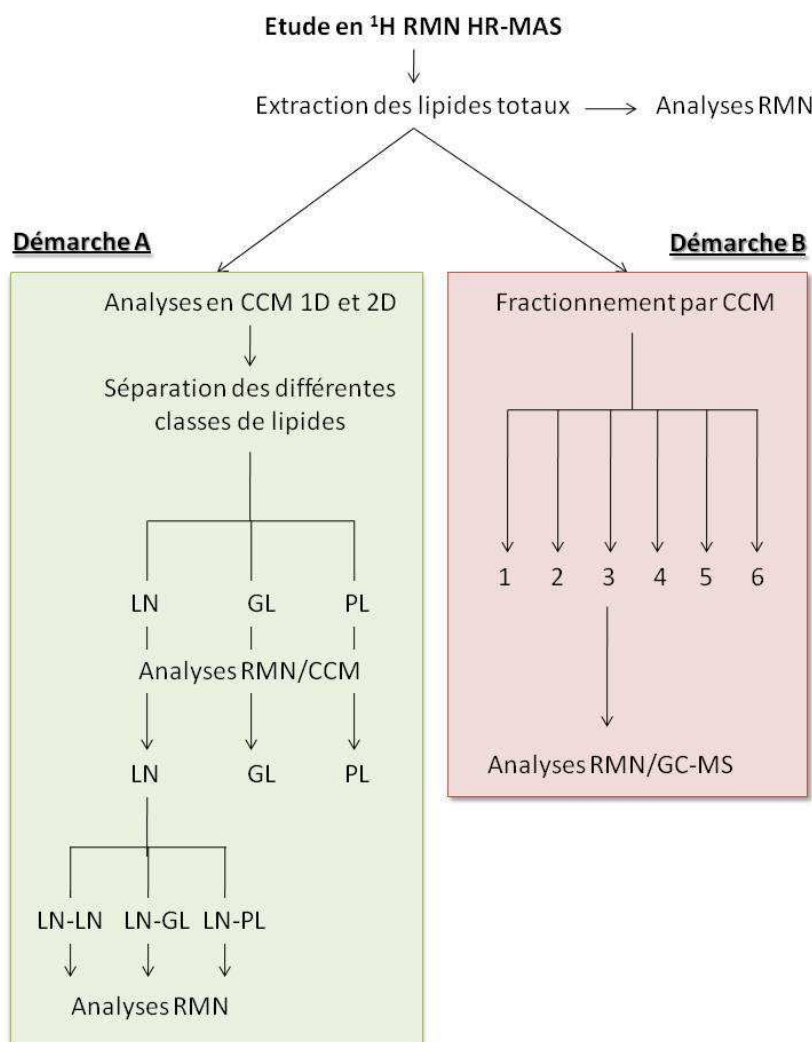


Figure 52 : Principales étapes de la démarche expérimentale menée lors de l'isolement de chimiomarqueurs au sein du genre *Turbinaria*. LN : lipides neutres, GL : galactolipides et dérivés, PL : phospholipides et dérivés.

La deuxième démarche (nommée démarche B, Figure 52) est plus visuelle. Elle a consisté en une **séparation des composés par CCM** et à la sélection d'au moins un spot discriminant qui est analysé par ^1H -RMN. L'**identification des composés** des spots discriminant les deux espèces sœurs s'est effectuée via des **analyses RMN et des analyses en GC/MS**. Enfin, dans le but de confirmer le caractère chimiomarqueur du(es) composé(s) identifié(s), nous avons recherché, par analyse en RMN des solutions, les signaux caractéristiques de ce(s) composé(s) au sein de l'ensemble des échantillons appartenant au genre *Turbinaria*.

Ces deux démarches ont eu pour but d'**isoler un chimiomarqueur permettant de différencier** les deux espèces sœurs *Turbinaria ornata* et *T. conoides*.

1.2.2. Obtention d'empreinte chimique par résonance magnétique nucléaire *in vivo*

Les analyses de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) ont été réalisées à l'aide d'une sonde HR-MAS $^1\text{H}/^{31}\text{P}$ sur le spectromètre BRUKER DRX Advance 500 (500 MHz) au service commun de RMN-RPE de l'UBO.

Cette étude a été menée dans un premier temps sur les échantillons de *Turbinaria* des îles Salomon car 3 espèces y sont présentes : *Turbinaria conoides*, *T. decurrens* et *T. ornata* (cf. Chapitre I, Figure 11). L'espèce *T. decurrens* ne présente pas de difficulté pour une détermination classique basée sur la morphologie. En effet, sa morphologie est différente de celle des deux autres espèces précédemment citées (cf. Chapitre I, § 2.6.3 - Espèces du genre *Turbinaria*, p. 75). *T. decurrens* a donc été utilisée comme groupe extérieur dans notre analyse.

Les échantillons d'algues lyophilisés ont consisté en 10 pédoncules de pleuridies prélevés par lot de *Turbinaria* étudié. Ils ont été placés dans un rotor à 5000 Hz de rotation. La sonde HR-MAS nous a permis d'obtenir directement un profil ^1H des échantillons algaux et ce, sans aucune extraction.

Cette méthode consiste à obtenir, via la technique de RMN *in vivo*, une empreinte chimique de l'échantillon testé, c'est-à-dire sa « carte d'identité chimique » et donc de confirmer l'identité de l'échantillon (c'est-à-dire l'espèce de *Turbinaria* à laquelle il appartient). Cette méthode a nécessité une mise au point particulière s'agissant de la première fois qu'une telle technique est utilisée en taxonomie, chez les macroalgues. Les spectres obtenus ont été comparés pour chaque échantillon et les données spectrales ont été analysées via des analyses en composantes principales (ACP).

Afin de valider la méthode mise au point, nous avons élargi le panel d'échantillons à d'autres zones géographiques (Nouvelle Calédonie, îles Fidji et Tahiti) du Pacifique Sud. Pour cette deuxième série d'analyse, 3 pleuridies de chaque échantillon réceptionné ont été prises au hasard et codées puis ces pédoncules ont été analysés par ^1H RMN HR-MAS. Chaque séquence de ^1H RMN HR-MAS a été effectuée en aveugle.

1.2.3. Obtention d'empreinte chimique par RMN des solutions (^1H -RMN)

Afin de confirmer le caractère chimiomarqueurs du(es) composé(s) identifié(s), nous avons analysé par RMN des solutions (spectromètre BRUKER DRX 400 (400 MHz)) les extraits lipidiques des échantillons étudiés en RMN *in vivo*. Afin d'être analysés en ^1H RMN, les extraits ont été repris dans du CDCl_3 .

1.2.4. Extraction des lipides

Les lipides totaux ont été extraits selon le protocole modifié par Le Lann (2006) d'après Caccamese et Azzolina (1979) et Caccamese *et al.* (1985).

Ainsi, 3 g d'algues lyophilisées sont extraits avec 30 mL d'un mélange de solvant dichlorométhane:méthanol (2:1, v:v) via un broyage à l'ultraturax. L'ensemble est ensuite homogénéisé puis filtré sur büchner. Le solide est récupéré et de nouveau broyé avec 30 mL de solvant d'extraction. L'opération est recommencée trois fois. Le filtre du büchner (filtre en papier Whatmann) est rincé avec 10 mL du solvant d'extraction, puis le filtrat récupéré (environ 100 mL) est transvasé dans une ampoule à décanter, sur lequel 20 mL de NaCl à 0,75 % sont rajoutés. Après agitation et dégazage de l'ampoule, celle-ci est stockée 2h à 4°C et à l'abri de la lumière afin que s'effectue la séparation de phase. Après dégazage, la phase organique est récupérée et le solvant est éliminé par évaporation rotative (température du bain-marie < 35°C).

1.2.5. Analyses des extraits lipidiques en chromatographie sur couche mince

La recherche de chimiomarqueurs nécessitant une forte biomasse de l'algue étudiée, elle a été effectuée sur des spécimens en provenance d'Ouiné en Nouvelle Calédonie.

Les analyses des extraits bruts et des classes de lipides ont été effectués par Chromatographie sur Couche Mince (CCM) selon différents protocoles. Toutes les expérimentations ont été effectuées sur des gels de silice déposés en couche mince sur une plaque d'aluminium et comportant un indicateur de fluorescence (TLC Silicagel 60 F₂₅₄, 20x20, MERCK). Dans la littérature, il existe plusieurs protocoles permettant d'analyser, en chromatographie sur couche mince, des extraits de nature lipidique. Nous avons choisi d'en tester 3, afin d'optimiser nos résultats (Tableau 11).

Tout d'abord un protocole de CCM à 2 dimensions (noté protocole 2D) élaboré d'après Kim *et al.* (1999). Ce protocole consiste à faire migrer les composés dans un premier solvant (solvant A), une fois la migration terminée, la plaque est séchée puis tournée à 90°. Une seconde migration est effectuée dans un deuxième solvant (solvant A').

Les deux autres protocoles utilisés concernent des systèmes de CCM à 1 seule dimension. Le premier protocole utilisé (noté protocole I) est celui décrit par Henderson et Tocher (1992) qui consiste à faire migrer les composés dans un premier solvant (solvant B) jusqu'à la moitié de la plaque, puis dans un second solvant

(solvant C) pour finaliser la migration (arrêt de la migration environ 1 cm du bord haut de la plaque). Le second protocole utilisé (noté protocole II) est adapté du premier, mais seul le second solvant (solvant C) est utilisé pour la migration.

Tableau 11: Protocoles de chromatographie sur couche mince utilisés dans l'analyse d'extraits bruts et de fractions lors de l'identification de chimiomarqueurs de *Turbinaria ornata* et *T. conoides*.

Protocoles	Système de solvant		Système de révélation
	Solvant A		UV
	Solvant A'		Dichlorofluoresceine
	Solvant B		Orcinol
2D	Chloroforme: méthanol: H ₂ O (65:25:4, v:v:v)		Diphenylamine
	Chloroforme: acétone: méthanol: acide acétique: H ₂ O (10:4:2:2:1, v:v:v:v:v)		Acide orthophosphorique & sulfate du cuivre
I	Solvant B		UV
	Acétate d'éthyle: propanol: chloroforme: méthanol: KCl à 0,25% (25:25:25:10:9, v:v:v:v:v)		Dichlorofluoresceine
II	Solvant C		UV
	Hexane:diéthyle éther:acide acétique glacial (80:20:2, v:v:v)		Orcinol
II	Solvant C		Diphenylamine
	Hexane:diéthyle éther:acide acétique glacial (80:20:2, v:v:v)		Acide orthophosphorique & sulfate du cuivre

Concernant la révélation des plaques de CCM, 5 systèmes ont été utilisés dans le protocole I contre seulement 2 dans le protocole II (Tableau 11).

Les divers systèmes de révélation des plaques de CCM (UV, l'orcinol, la diphenylamine, la dichlorofluoresceine et le complexe acide orthophosphorique : sulfate de cuivre) sont adaptés d'après Henderson et Tocher (1992) et sont détaillés en annexe III-2. Brièvement, l'orcinol et la diphenylamine permettent la révélation des glycolipides et dérivés alors que la dichlorofluoresceine et le complexe acide orthophosphorique:sulfate de cuivre permettent la révélation des lipides de façon non spécifique.

1.2.6. Séparation des différentes classes de lipides

Suite aux analyses effectuées en CCM de la démarche A (Figure 52), nous avons fractionné les extraits bruts de *Turbinaria ornata* et *T. conoides* afin de séparer les différentes classes de lipides. La séparation des différentes classes de lipides (lipides neutres, galactolipides, phospholipides et dérivés) s'est effectuée selon le protocole décrit par Christie (2003) (Figure 53).

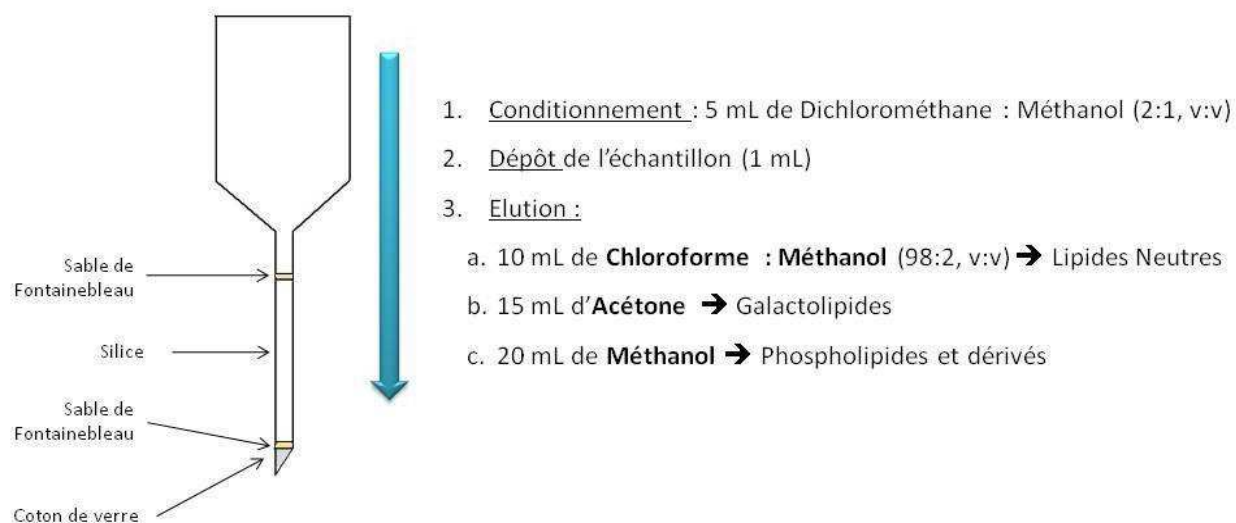


Figure 53 : Synoptique du protocole de séparation des classes de lipides sur micro-colonne ouverte de silice (d'après Christie 2003).

Ainsi, la fraction éluée par le mélange de solvants chloroforme:méthanol (98:2, v:v) contient des lipides neutres (notée LN), la fraction éluée à l'acétone contient les galactolipides et dérivés (notée GL) et celle éluée au méthanol contient des phospholipides et dérivés (notée PL). La silice utilisée est du Silicagel 60, 0,063-0,200 mm (Merck). Les trois fractions ainsi obtenues ont été analysées par CCM et RMN du proton.

1.2.7. Analyses en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

Les analyses en Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (notée CG/MS) ont été réalisées par le laboratoire de Pharmacognosy, School of Pharmacy, University of Athens (Greece), par l'équipe du Pr. Vassilios Roussis.

Les appareillages et techniques utilisés sont les suivants :

- CG/MS : Hewlett-Packard 5973 Mass Selective Detector operant en mode EI à 70 eV
- Colonne CG : HP-5 MS fused silica capillary column (30 m x 0.25 mm, film thickness)

Les fractions obtenues via les analyses CCM des extraits lipidiques de *Turbinaria conoides* et *T. ornata* ont été analysé en GC/MS. Au cours de ce travail, la fraction obtenue via le spot CCM de l'extrait brut de *Turbinaria conoides* d'Ouiné (Nouvelle Calédonie) a subi une silylation. La silylation est une méthode de dérivation qui utilise des noyaux silicium. Ici, l'extrait analysé a été dérivé avec du N-(trimethylsilyl)-imidazole (Merck). La dérivation est utilisée en CG afin de modifier la volatilité des composés à analyser. Dans le cas présent, la silylation a permis de rendre le composé à analyser plus volatile et ainsi de permettre sa séparation et donc son identification par le système de détection (MS).

1.2.8. Analyses RMN

Les extraits et les fractions ont été tous repris dans du CDCl_3 . Les spectres RMN du proton des extraits bruts ont été obtenus à partir d'un spectromètre BRUKER DRX 400 (400 MHz) (Service commun de RMN-RPE de l'UBO). Les spectres RMN du carbone et les expérimentations 2D ont été effectués sur un spectromètre BRUKER DRX Advance 500 (500 MHz).

1.3.Résultats

1.3.1. Empreintes chimiques par RMN *in vivo*

1.3.1.1. Mise au point de la technique utilisant la ^1H RMN HR-MAS

La méthode de discrimination des deux espèces sœurs utilisant la technique RMN HR-MAS a fait l'objet d'une publication dans le journal **Talanta**. La référence de cet article, présenté p. 190, est :

Le Lann K, Kervarec N, Payri CE, Deslandes E & V Stiger-Pouvreau (2008) Discrimination of allied species within the genus *Turbinaria* (Fucales, Phaeophyceae) using HRMAS NMR spectroscopy. Talanta 74: 1079-1083.

En résumé, nous avons mis au point une nouvelle méthode chimiotaxonomique basée sur la spectroscopie ^1H RMN HR-MAS à une dimension. Cette puissante technique nous a permis, par une simple analyse des spectres obtenus, de distinguer des spécimens appartenant aux deux espèces sœurs : *Turbinaria ornata* et *T. conoides*. Basée sur l'analyse de spectres, les résultats nous ont permis de regrouper, avec un succès de 100%, tous les spécimens en fonction de leur appartenance spécifique. Ainsi, cette étude prouve l'efficacité de la RMN *in vivo* pour (1) la discrimination des espèces de *Turbinaria* et (2) une identification préliminaire de chimiomarqueurs potentiels.



Short communication

Discrimination of allied species within the genus *Turbinaria* (Fucales, Phaeophyceae) using HRMAS NMR spectroscopy

K. Le Lann^a, N. Kervarec^b, C.E. Payri^{c,d}, E. Deslandes^a, V. Stiger-Pouvreau^{a,*}

^a Laboratoire d'Ecophysiologie et de Biotechnologie des Halophytes et des Algues Marines (LEBHAM EA 3877), Institut Universitaire Européen de la Mer, Université de Bretagne Occidentale, Place Nicolas Copernic, 29280 Plouzané, France

^b Résonance Magnétique Nucléaire-Résonance Paramagnétique Électronique, 6 avenue, Victor-Le-Gorgeu-CS93837, 29238 Brest Cedex 3, France

^c UMR 7138/UR R148 "Systématique, Adaptation, Evolution", Institut de Recherche pour le Développement, B.P. A5 98848, Nouméa Cedex, Nouvelle-Calédonie, France

^d Université de la Polynésie Française, Tahiti, France

Received 23 May 2007; received in revised form 31 July 2007; accepted 9 August 2007

Available online 23 August 2007

Abstract

A novel chemotaxonomical method based on 1D ¹H HRMAS NMR spectroscopy is being tested for taxonomical purposes. This powerful technique allowed us to discriminate between specimens belonging to two sister species of *Turbinaria*, which are difficult to tell apart using only morphological characters. Based on spectra analysis, the results allowed us to successfully group the specimens according to their species. Thus, the efficiency of HRMAS NMR spectroscopy for the discrimination of algal species and for the pre-screening of potential chemomarkers is demonstrated.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: HRMAS NMR spectroscopy; *Turbinaria* species; Phaeophyceae; Chemotaxonomy; Species discrimination

1. Introduction

Turbinaria is a widespread tropical genus within the Phaeophyceae. It is relatively species-poor; with so far only 17 species having been described and assigned to the genus [1]. However, the web site AlgaeBase lists 54 species names, of which 22 are actually flagged as current [2]. In the Indo-Pacific region, *Turbinaria ornata*, *Turbinaria conoides* and *Turbinaria decurrens* are currently recorded. While *T. ornata* is the most common and widespread species extending its distribution from the African east coast to the central Pacific Ocean including Hawaii and French Polynesia, *T. conoides* is not recorded from the French Polynesian area or Hawaiian waters, and *T. decurrens* is restricted to the western part of the tropical Pacific Ocean. Taxonomically speaking, *T. decurrens* is the most easily distinguishable from morphological features, while both *T. conoides* and *T. ornata* display great morphological variations which can

generate identification ambiguities, especially when looking at the shapes of the leaf blades [3].

Despite the limited number of *Turbinaria* species, this genus is morphologically complex. Several authors recognized a wide variety of forms [1] (for review). This plasticity is correlated with habitat in response to environmental conditions [1,4,5]. Various studies on *T. ornata* have shown the effect of hydrodynamism on the thallus morphology, the buoyancy and the phenological plasticity [6–9]. Despite this high phenological variability, the morphological species concept remains the basis for algal taxonomy [10], including the genus *Turbinaria* [1] for which the shape of the leaf is one of the major taxonomical criteria to tell the species apart [1,3,11,12]. Because of the complex morphological variations, this criterion may be a source of confusion in identifications, and morphological classifications need to be improved by molecular studies [12]. However these tools depend on the nature of the biological material, i.e. buds or reproductive organs for DNA extraction, and the availability of good genetic markers; these studies can be long, difficult and expensive, especially since *T. ornata* and *T. conoides* are two closely related sister species [12]. In this context, high-resolution magic angle spinning (HRMAS) NMR spectroscopy, a recent

* Corresponding author. Tel.: +33 2 98 49 88 06; fax: +33 2 98 49 87 72.

E-mail addresses: Valerie.Stiger@univ-brest.fr, stiger@univ-brest.fr (V. Stiger-Pouvreau).

non-invasive technique, has been considered as a promising analytical method to discriminate between the species concerned. It was shown, for instance, to be a reliable tool to differentiate strains of bacteria [13,14], to analyse food materials [15–20] or to diagnose the spread of prostate cancer [21]. This method is a fast, non-destructive technique, which does not require any preliminary extraction and requires only a little sample preparation. Moreover, HRMAS allows obtaining high-resolution spectra from intact samples, comparable to those achievable with liquid extracts [22]. At this time, with HRMAS, it is possible to analyse minute amounts of intact plant material using 1D and 2D spectra of *in vivo* low molecular mass compounds, as well as spectra of structural polymers [23]. The HRMAS technique is also well suited to the monitoring of the accumulation or disappearance of various classes of metabolites. Some studies indicated that this method could discriminate food material samples according to their geographical origin [17–20].

In this study, the usefulness of HRMAS as an analytical tool to discriminate closely related macroalgal species of the genus *Turbinaria* is demonstrated for the first time.

2. Materials and methods

2.1. Sampling sites and species

Specimens of *T. conoides*, *T. decurrens* and *T. ornata* were collected during the austral winter, from two different regions of the South Pacific, namely the Solomon Island (SI) and New Caledonia (NC), as shown in Table 1. Some samples were not named because morphological ambiguities could not allow us to differentiate *T. ornata* from *T. conoides* and they were then labelled as *Turbinaria* sp. (Table 1).

Field-collected samples were separated into two batches: one was freeze-dried and sent to the first author for chemotaxonomical analysis (this study) and the second was used for a molecular and taxonomical studies [12]. *T. decurrens* was considered as the outgroup of our analysis, since this species is easily distinguish-

able from the two closely related species, *T. conoides* and *T. ornata*.

2.2. NMR spectroscopy

The method developed in this study is based on the use of HRMAS NMR spectroscopy.

All HRMAS spectra were acquired on a Bruker DRX 500 spectrometer equipped with an indirect HRMAS $^1\text{H}/^{31}\text{P}$ probe-head with gradient Z at 25 °C. A typical proton ^1H HRMAS spectrum consisted of 64 scans, and was performed with pre-saturation of the water peak. Each spectrum was phased and baseline-corrected using a polynomial function.

2.3. HRMAS sample preparation

For the HRMAS spectra, peduncles of leaves were randomly selected on the sampled thalli belonging to each region (SI and NC). About 5 mg of each peduncle was put in a vial with zirconium oxide, and set into a 4 mm MAS rotor. Approximately 30 μL of D_2O was added into the rotor with the leaf sample for ^2H field locking (depending on the quantity of the freeze-dried leaf sample). The sample was placed in a rotor spinning around an axis, which is oriented at the so-called magic angle of 54.7° with respect to the magnetic field \mathbf{B}_0 . Good homogenization was obtained at a spinning rate of 5000 Hz. This results in a high-resolution NMR spectrum approaching that obtained using liquid samples, making spectra analysis possible.

In this study, three HRMAS spectra, corresponding to three independently prepared rotors, were recorded for each sample. Thus 6 spectra for *T. decurrens*, 9 for *T. ornata*, 15 for *T. conoides* and 9 for *Turbinaria* sp. were obtained.

Peduncles of leaves were chosen because: (1) leaves are useful for morphological taxonomy [12] and (2) the shape of peduncles allows a very good fit within the HRMAS rotor. In this way, spectra resolutions were improved.

Table 1

List of species, sampling data and herbarium accession numbers of *Turbinaria* species used in this present study

Species	Locality	Accession number	Date	Collector
<i>Turbinaria decurrens</i>	Solomon, Malaïta island, Anuta Paina	IRD—S.852-740	July 18, 2004	Payri
<i>T. decurrens</i>	Solomon, Malaïta island, Lau Lagoon	IRD—S.848-685	July 16, 2004	Payri
<i>Turbinaria conoides</i>	Solomon, Nggela Island, NW	IRD—S.842-566	July 12, 2004	Payri
<i>T. conoides</i>	Solomon, Malaïta island, Lau Lagoon	IRD—S.850-702	July 17, 2004	Payri
<i>T. conoides</i>	New Caledonia, Séche Croissant	KLL—Tc.1	April 5, 2006	Payri
<i>T. conoides</i>	New Caledonia, Séche Croissant	KLL—Tc.2	April 5, 2006	Payri
<i>T. conoides</i>	New Caledonia, Séche Croissant	KLL—Tc.3	April 5, 2006	Payri
<i>Turbinaria ornata</i>	Solomon, Malaïta island, Anuta Paina	IRD—S.852-741	July 18, 2004	Payri
<i>T. ornata</i>	New Caledonia, Séche Croissant	KLL—To.1	April 5, 2006	Payri
<i>T. ornata</i>	New Caledonia, Séche Croissant	KLL—To.2	April 5, 2006	Payri
<i>T. ornata</i>	New Caledonia, Séche Croissant	KLL—To.3	April 5, 2006	Payri
<i>Turbinaria</i> sp.	New Caledonia, Nouville	KLL—T.sp.1	April 4, 2006	Payri
<i>Turbinaria</i> sp.	New Caledonia, Nouville	KLL—T.sp.2	April 4, 2006	Payri
<i>Turbinaria</i> sp.	New Caledonia, Nouville	KLL—T.sp.3	April 4, 2006	Payri
<i>Turbinaria</i> sp.	New Caledonia, Nouville	KLL—T.sp.4	April 4, 2006	Payri
<i>Turbinaria</i> sp.	New Caledonia, Nouville	KLL—T.sp.5	April 4, 2006	Payri
<i>Turbinaria</i> sp.	New Caledonia, Nouville	KLL—T.sp.6	April 4, 2006	Payri

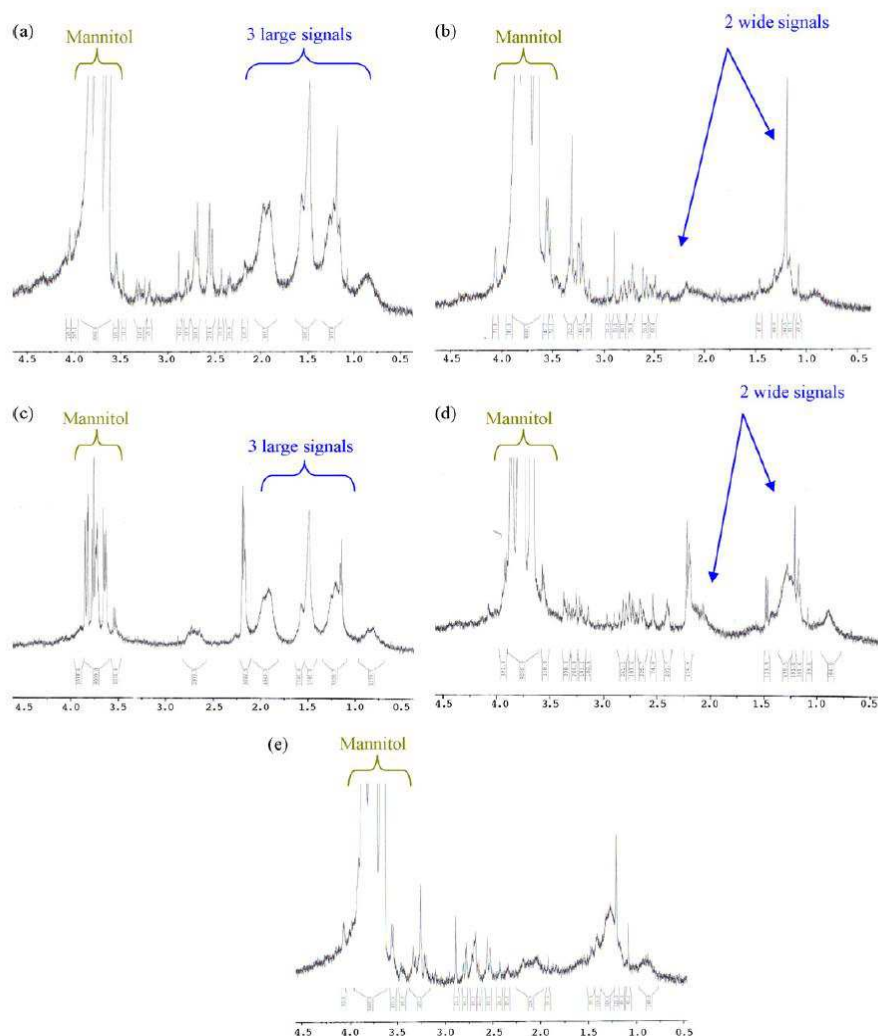


Fig. 1. Proton of HRMAS NMR spectra of (a) *Turbinaria conoides* from Solomon Islands, (b) *Turbinaria ornata* from Solomon Islands, (c) *T. conoides* from New Caledonia, (d) *T. ornata* from New Caledonia and (e) *Turbinaria decurrens* from Solomon Islands.

2.4. Statistical analysis

HRMAS data were subjected to statistical analysis. Statsoft Statistica release 6.0 for Windows was used to perform tests. The statistical procedure used in this study was based on a principal components analysis (PCA) to illustrate *Turbinaria* species' HRMAS discrimination. PCA test was performed with the following three species: *T. decurrens*, *T. ornata* and *T. conoides* to highlight the powerfulness of the HRMAS method. Variables used to perform the PCA were the signals of each HRMAS spectrum (three for each sample) between 0 and 4.00 ppm, since some chemical shifts appeared to differ between species samples in this specific spectral region.

3. Results and discussion

The comparison of the ^1H HRMAS NMR spectra (four of them are shown in Fig. 1) revealed one main difference between *T. ornata* and *T. conoides* spectra, whatever the geographic region: spectra of *T. ornata* show two wide signals, while spectra of *T. conoides* has three large signals between 0.8 and 3 ppm. The spectra of *T. decurrens* are similar to those of *T. ornata*. These different signals between *T. conoides* and *T. ornata* spectra were observed in the characteristic domain of saturated and unsaturated fatty acids, as already demonstrated in other materials [17,18,20]. The different profiles of fatty acids in *Turbinaria* appear to relate to the species, and not to the geographical origin. For two *Sargassum* species, some significant variations in

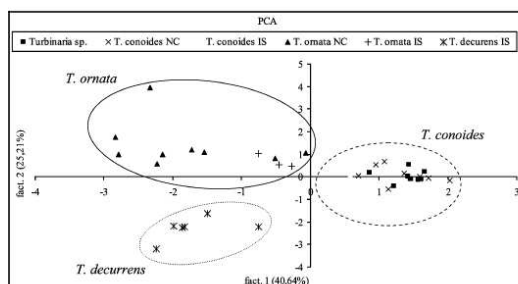


Fig. 2. Principal component analysis (PCA): projection of 36 spectral observations issued from the three species, *T. conoides*, *T. ornata* and *T. decurrens* on the Factor 1 vs. Factor 2 planes. NC: New Caledonia; SI: Solomon Islands.

the fatty acid contents were observed from specimens coming from the Yellow Sea (China) and from the Japan Sea [24]. However, geographical variations of metabolites composition of marine algae were non-significant and could be minimised [25,26]. However, seasonal variations in algal metabolites content still exist [27], and it is the reason why our material was sampled during the same season (austral winter). Nevertheless, the same experiment should be carried out during the austral summer to test for any seasonality in the fatty acid contents in these species.

Fig. 2 shows a biplot of the normalized scores in the Factor 1–Factor 2 areas. From this plot, one can see that it seems reasonable to attempt a clustering of these objects in the terms of these PCAs. All principal components or factors had an eigenvalue greater than 1, and explained 100% of the total variance. The sample projection on all the factor axes allowed us to choose Factors 1 and 2, which represented 65.85% of the total variance. The clustering technique is based on the sample similarity expressed according to the presence of signal. The *T. ornata* group is located on the negative side of the Factor 1-axis and on the positive side of the Factor 2-axis, whereas the *T. conoides* group is located on the positive side of the two factors axes. The outgroup consisting of *T. decurrens* has dispersed scores on the negative side of the two factors axes. Statistical tests applied to the HRMAS NMR data discriminate without ambiguity the different samples, especially the two sister species *T. ornata* and *T. conoides*.

Furthermore, this method was validated by processing all HRMAS spectra without knowing their species rank. The species assignment for the specimens was 100% correct. *Turbinaria* sp. samples of NC were located with the *T. conoides* group. The specificity of these samples was later confirmed using morphological and molecular studies [3]. The dispersion of scores in PCA could be explained by the heterogeneity of samples within a same group, as demonstrated in [19]. Despite the small number of samples studied, HRMAS NMR spectra combined with statistical analysis allowed us to discriminate between *T. ornata* and *T. conoides*. We obtained 100% correct reclassification although these species are considered like “sister species” [12]. This score was better than other HRMAS studies [16–20]. However, the latter studies focussed on geographi-

cal variations, whereas the present study looked at interspecific variations.

While a few studies have used the HRMAS technique for taxonomical purposes, none had approached chemotaxonomy. Most of the authors have used this technique for a geographical discrimination and/or classification for cheese [17,19,20] or for dried beef [18]. This technique was also applied to bacteria for separating mutant from non-mutant strains [14] and to diagnose for the spread of cancer [21]. All of these studies, included our own experimental analysis on a genus of brown algae, highlight the powerfulness of HRMAS to discriminate between samples at the specific level.

However, our results should be confirmed by the analysis of a larger set of specimens sampled from various geographical regions (e.g. Fiji Islands, Micronesia, Samoa, Australia). The characterisation of the non-polar chemomarkers of *T. ornata* and *T. conoides* is currently in progress with NMR and GC analyses.

4. Conclusion

HRMAS NMR appears to be a quick and reliable method for discrimination and taxonomic studies, providing results analogous to those of standard analysis protocols in the case of the brown algal genus *Turbinaria*. The main advantage of HRMAS is the rapidity in obtaining the results (about 10 min for each analysis), even in the absence of reproductive organs or enough buds, which are the limiting factors in DNA extraction of macroalgae. The limited pre-treatment of the samples and the sensitivity of the method make the HRMAS technique an efficient taxonomical tool to discriminate between species. Even if the HRMAS method cannot be substituted to either morphological or molecular phylogenetic analyses, its first taxonomical use within the genus *Turbinaria* is a promising start for other studies.

Acknowledgments

This study is part of the Ph.D. project carried out by the first author at IUEM (UBO), within the Laboratory of Ecophysiology and Biotechnology of Halophytes and Marine algae (LEBHAM), in collaboration with the Common NMR Service of the University of Occidental Brittany (Université de Bretagne Occidentale). This research was supported in part by the Coral Reef Initiative Programme for South Pacific (CRISP) and by the French Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement supérieur et de la Recherche. This is contribution No. 1045 of the IUEM, European Institute for Marine Studies (Brest, France). Additional thanks are due to Dr. A. N'Yeurt for revising the English of the manuscript and to two anonymous reviewers for their helpful suggestions.

References

- [1] M.J. Wynne, Phycol. Res. 50 (2002) 283.

- [2] M.D. Guiry, G.M. Guiry, *AlgaeBase* version 4.2, 2007. <http://www.algaebase.org>.
- [3] A. Rohfritsch, PH.D. Thesis, Sciences de l'environnement marin, Université de Polynésie Française, 2006, p. 242.
- [4] L.N. De Senerpont Domis, N. Lisette, P. Fama, A.J. Bartlett, W.F. Prud'homme Van Reine, C.A. Espinosa, C.G. Trono, *J. Phycol.* 39 (2003) 1019.
- [5] M. Koehl, *Proceedings of the Third International Plant Biomechanics Conference*, Thieme Verlag, Stuttgart, 2000, pp. 295–308.
- [6] C.E. Payri, *Bot. Mar.* 27 (1984) 327.
- [7] V. Stiger, C.E. Payri, *Bot. Mar.* 42 (1999) 295.
- [8] H.L. Stewart, *J. Marine Syst.* 49 (2004) 157.
- [9] H.L. Stewart, *Mar. Biol.* 149 (2006) 721.
- [10] R. Wattier, C.A. Maggs, *Adv. Bot. Res.* 35 (2001) 171.
- [11] R.W.M. Taylor, *J. Linn. Soc.* 58 (1963) 475.
- [12] A. Rohfritsch, C.E. Payri, V. Stiger, F. Bonhomme, *Biochem. Syst. Ecol.* 35 (2007) 91.
- [13] W. Li, *Analyst* 131 (2006) 777.
- [14] S. Gudlavalleti, C.M. Szymanski, H.C. Jarrell, D.S. Stephens, *Carbohydr. Res.* 341 (2006) 557.
- [15] A.M. Gil, I.F. Duarte, I. Delgadillo, I.J. Colquhoun, F. Casuscelli, E. Humpfer, M. Spraul, *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 1524.
- [16] A.P. Sobolev, A. Segre, R. Lamanna, *Magn. Reson. Chem.* 41 (2003) 237.
- [17] L. Shintu, F. Ziarelli, S. Caldarelli, *Magn. Reson. Chem.* 42 (2004) 396.
- [18] L. Shintu, S. Caldarelli, B.M. Franke, *Meat Sci.* 76 (2007) 700.
- [19] L. Shintu, S. Caldarelli, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 4026.
- [20] L. Shintu, S. Caldarelli, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 4148.
- [21] L.L. Cheng, M.A. Burns, J.L. Taylor, W. He, E.F. Halpern, W.S. McDougal, C.-L. Wu, *Cancer Res.* 65 (2005) 3030.
- [22] L.L. Cheng, C.-L. Wu, M.R. Smith, R.G. Gonzalez, *FEBS Lett.* 494 (2001) 112.
- [23] M. Defernez, I.J. Colquhoun, *Phytochemistry* 62 (2003) 1009.
- [24] V.E. Vaskovsky, S.V. Khotimchenko, B. Xia, L. Hefang, *Phytochemistry* 42 (1996) 1347.
- [25] A. Praud, R. Valls, L. Piovetti, B. Banaigs, J.-Y. Benaïm, *Phytochemistry* 40 (1995) 495.
- [26] R. Valls, L. Piovetti, *Biochem. Syst. Ecol.* 23 (1996) 723.
- [27] G.V. Joshi, C.A. Gowda, *Ind. J. Mar. Sci.* 4 (1975) 165.

1.3.2. Validation de la technique par l'élargissement de l'échantillonnage à différentes zones géographiques

Les résultats sont cohérents avec ceux préalablement obtenus pour les échantillons des îles Salomon et ceux de Nouvelle Calédonie (Figure 54).

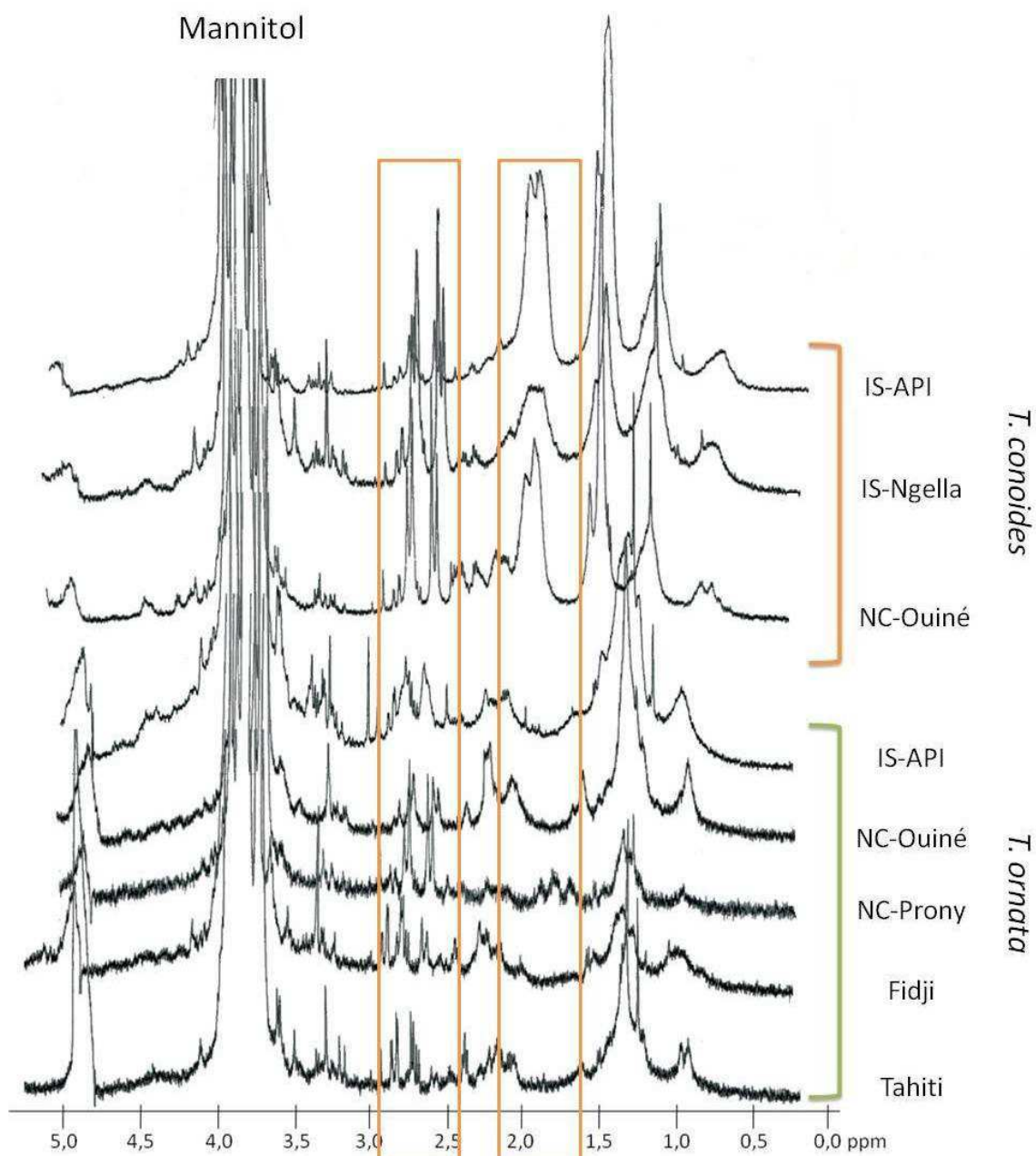


Figure 54 : Spectres ^1H RMN HR-MAS des 8 échantillons du genre *Turbinaria* récoltés au sein du Pacifique Sud. Tous les spectres ont été alignés sur le signal du mannitol (M). IS : îles Salomon, API : Anuta Paina Island, NC : Nouvelle Calédonie. Les signaux discriminants les plus facilement identifiables sont entourés en orange.

Le mannitol (signaux vers 4 ppm) est dominant chez tous les spécimens, quelle que soit l'espèce. Au sein d'une même espèce collectée à différents endroits dans le Pacifique Sud, les signaux sont similaires (Figure 54). Ainsi l'espèce *Turbinaria conoides* présente des signaux larges vers 1,0 ppm, 1,5 ppm et 2,0 ppm et un signal du citrate (signaux entre 2,5 et 3,0 ppm) d'intensité importante. L'espèce *T. ornata* montre des signaux larges vers 0,9 ppm et vers 1,4 ppm et un signal du citrate (signaux entre 2,5 et 3,0 ppm) d'intensité moins importante que l'espèce précédente.

Les résultats de l'analyse en composantes principales (ACP) effectuée à partir des données de HR-MAS RMN ^1H ont permis de regrouper les échantillons par espèces (Figure 55). Quelque soit leur provenance géographique, tous les échantillons de *T. ornata* présentent des coordonnées positives sur les facteurs 1 et 2 alors que les échantillons de *T. conoides* montrent des coordonnées négatives sur les deux axes (facteurs 1 et 2).

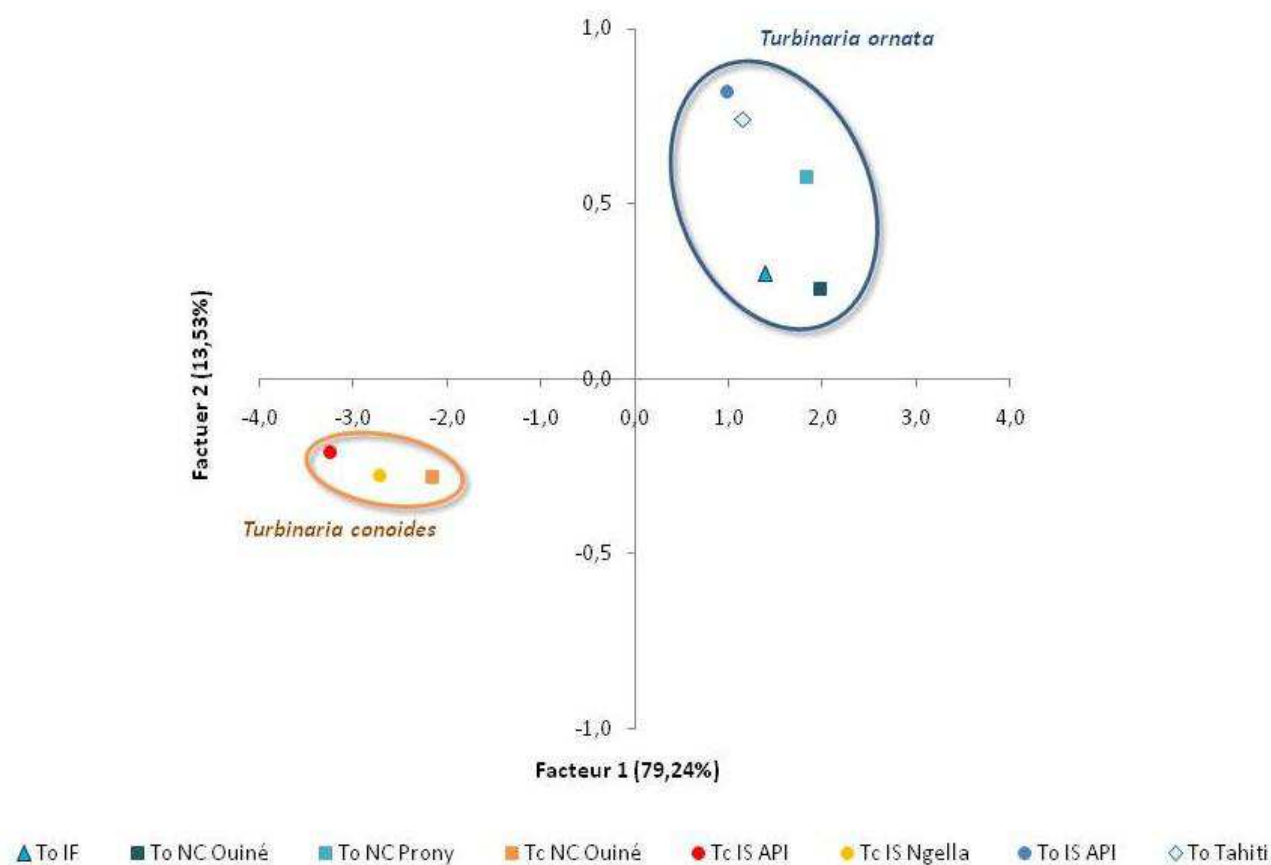


Figure 55 : Analyse en composantes principales effectuée à partir des données ^1H RMN HR-MAS des 8 échantillons du genre *Turbinaria* récoltés au sein du Pacifique Sud. To : *Turbinaria ornata*, Tc : *Turbinaria conoides*, IS : îles Salomon, API : Anuta Paina Island, LL : Lau Lagoon, NC : Nouvelle Calédonie, IF : îles Fidji.

Ainsi, comme le montre la Figure 54, deux critères significatifs sont à retenir pour distinguer *T. conoides* de *T. ornata* par la HRMAS. Il s'agit, d'une part du nombre de signaux larges dont les déplacements chimiques sont inférieurs à 2,5 ppm et d'autre part l'intensité du signal du citrate, le critère du nombre de signaux larges étant le critère le plus significatif (Tableau 12).

Tableau 12 : Critères retenus pour la distinction des espèces de *Turbinaria* par HRMAS. En gras sont signalés les signaux les plus discriminants retenus pour la suite de l'étude.

	<i>T. conoides</i>	<i>T. ornata</i>
Signaux larges provenant de composés lipidiques < à 2,5 ppm	3 signaux	2 signaux
Citrate (signaux entre 2,5 ppm et 3,0 ppm)	Signal généralement important	Signal généralement assez petit

Ainsi, pour une espèce donnée (*Turbinaria ornata* ou *T. conoides*) et quelle que soit la provenance géographique au sein du Pacifique Sud, les empreintes chimiques obtenues sont semblables.

1.3.3. Empreintes chimiques par ^1H RMN des solutions

Les extraits bruts apolaires (extraction des lipides totaux) ont été analysés en ^1H -RMN haute résolution (400 MHz). Des signaux caractéristiques de chaque espèce ont été observés et ont été retenus comme critères discriminants pour la distinction des espèces *Turbinaria ornata* et *T. conoides*. Les signaux à prendre en compte pour différencier les deux espèces sont, comme le montre la Figure 56 :

→ les signaux entre 1,5 et 2,5 ppm

→ et ceux entre 5,0 et 5,5 ppm.

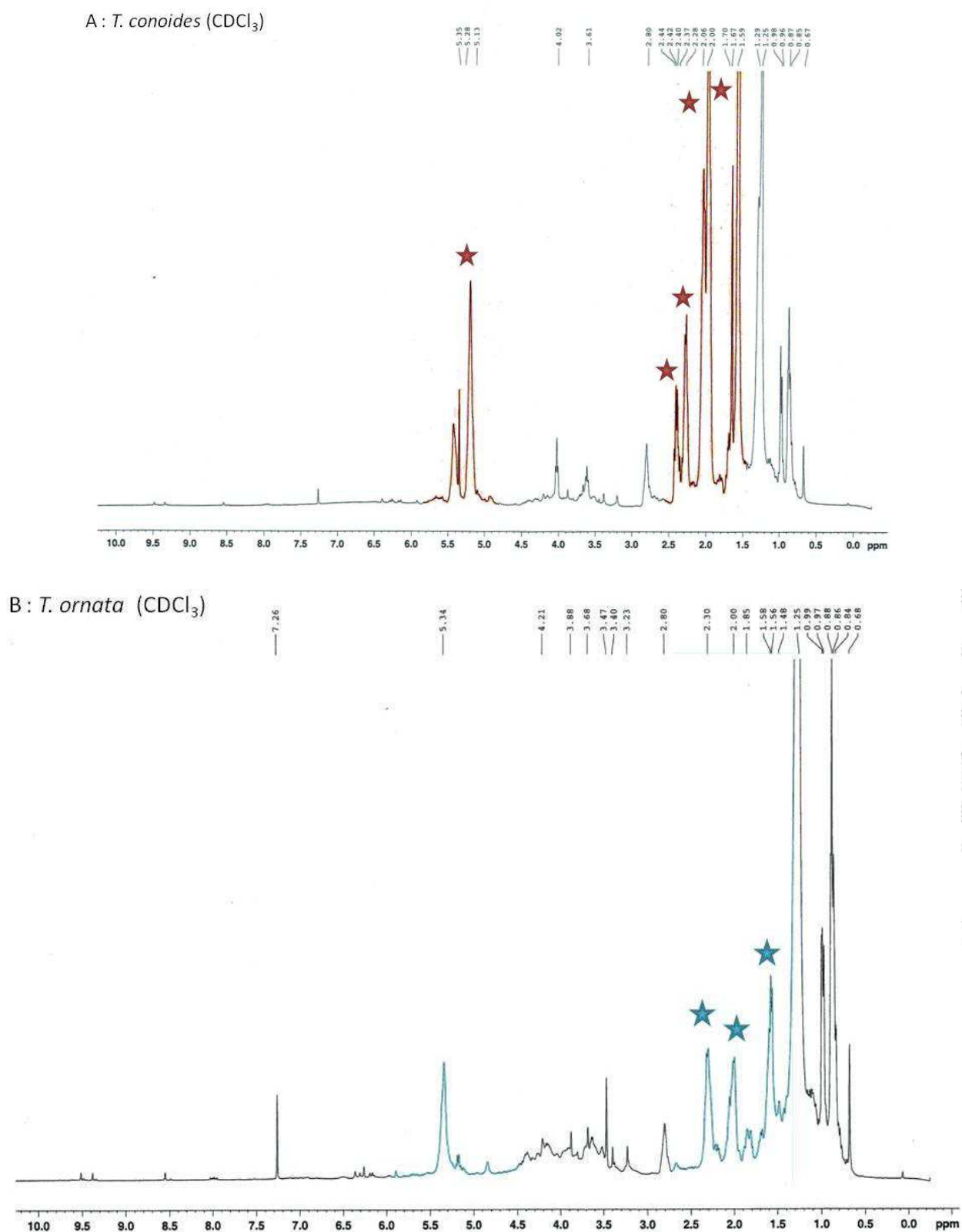


Figure 56 : Spectres ¹H-RMN des extraits apolaires de *Turbinaria conoides* (A) et de *T. ornata* (B). Les signaux discriminants sont marqués par une étoile et sont colorés en rouge chez *T. conoides* et en bleu chez *T. ornata*.

1.3.4. Analyses CCM des extraits bruts de *Turbinaria ornata* et *T. conoides* de Nouvelle Calédonie (Ouiné) (démarche A)

Suite aux spectres ^1H -RMN obtenus, nous avons analysé les extraits bruts en CCM 1D (protocole I) et en CCM 2D (protocole 2D).

En CCM 1D, l'extrait apolaire de *Turbinaria conoides* présente des spots qui n'apparaissent pas lors de l'analyse de l'extrait de *T. ornata* (Figure 57). Ces composés lipidiques ne semblent pas présenter de groupement glycosilé. En effet, ils sont révélés uniquement par la dichlorofluoresceine et/ou le couple « acide orthophosphorique- sulfate de cuivre ». Les R_f des trois spots distinctifs sont les suivants : 0,11 ; 0,61 et 0,85 (Figure 57).

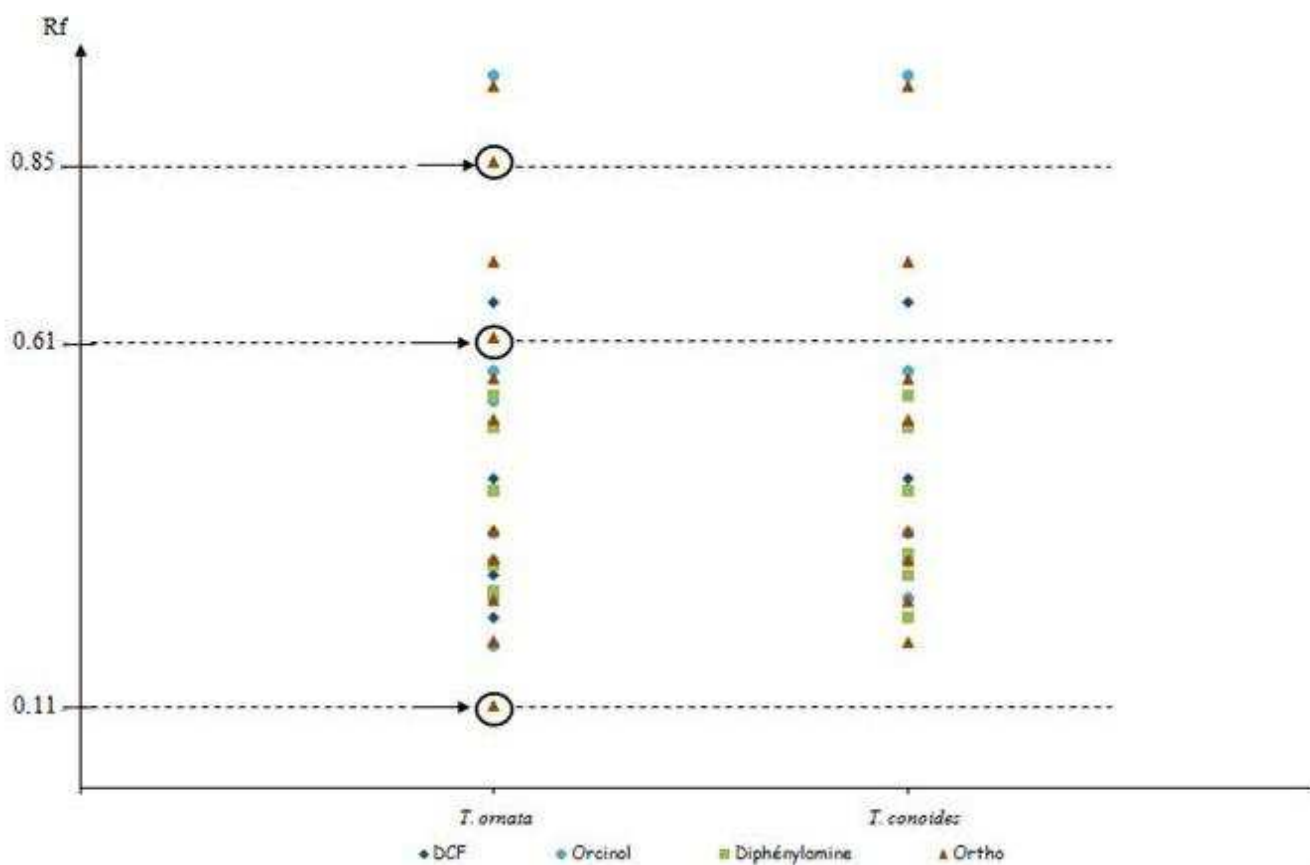


Figure 57 : Schéma des résultats obtenus en chromatographie sur couche mince selon le protocole I. DCF : dichlorofluoresceine, Ortho : Acide orthophosphorique & sulfate du cuivre, diphényl : Diphenylamine, Orcinol : Orcinol. Les flèches et les cercles indiquent les composés intéressants et considérés comme chimiomarqueurs de *T. conoides*. Les échantillons de *T. conoides* et *T. ornata* proviennent de Nouvelle Calédonie (Ouiné).

De même, en CCM 2D, l'extrait apolaire de *Turbinaria conoides* présente un spot qui n'apparaît pas lors de l'analyse de l'extrait de *T. ornata*. Ce composé lipidique ne semble pas présenter de groupement glycosilé. En effet, il est révélé uniquement par la dichlorofluoresceine et/ou le couple « acide orthophosphorique/sulfate de cuivre ». Les R_f de ce composé sont les suivants : 0,56 pour le premier développement et 0,55 pour le second développement (Figure 58).

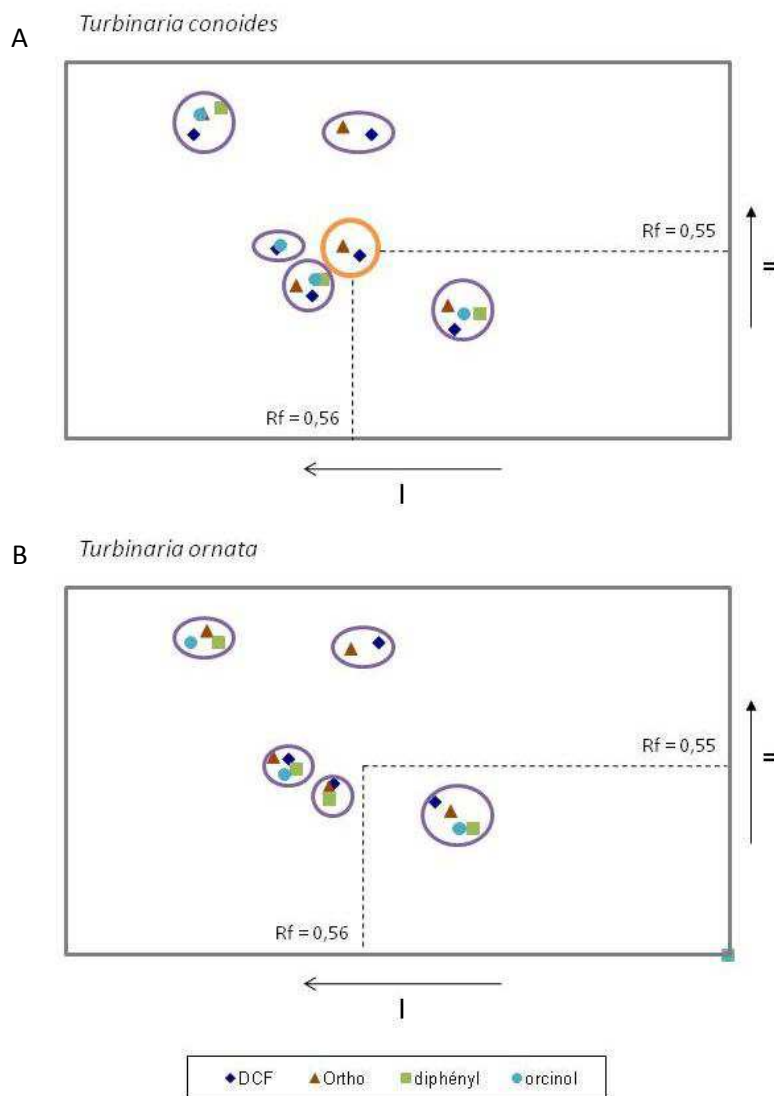


Figure 58 : Schéma des résultats obtenus en chromatographie sur couche mince en 2 dimensions pour *Turbinaria conoides* (A) et *T. ornata* (B) de Nouvelle Calédonie (Ouiné). Systèmes de révélation : DCF : dichlorofluoresceine, Ortho : Acide orthophosphorique & sulfate de cuivre, diphenyl : Diphenylamine, Orcinol : Orcinol. Le spot permettant de distinguer l'extrait de *T. conoides* de celui de *T. ornata* est entouré en orange.

1.3.5. Séparation des classes de lipides et analyses des fractions obtenues en CCM (démarche A)

Suite au fractionnement des extraits lipidiques selon le protocole de séparation des classes lipidiques, les 3 fractions, notées LN (lipides neutres), GL (glycolipides ou galactolipides) et PL (phospholipides) ainsi obtenues ont été analysées en ^1H -RMN et en CCM selon le protocole I.

Seuls les spectres ^1H -RMN de la fraction LN conservent les différences de signaux observées au niveau des extraits bruts. En effet, on retrouve des différences de signaux vers 2,0 et 5,0 ppm (Figure 59).

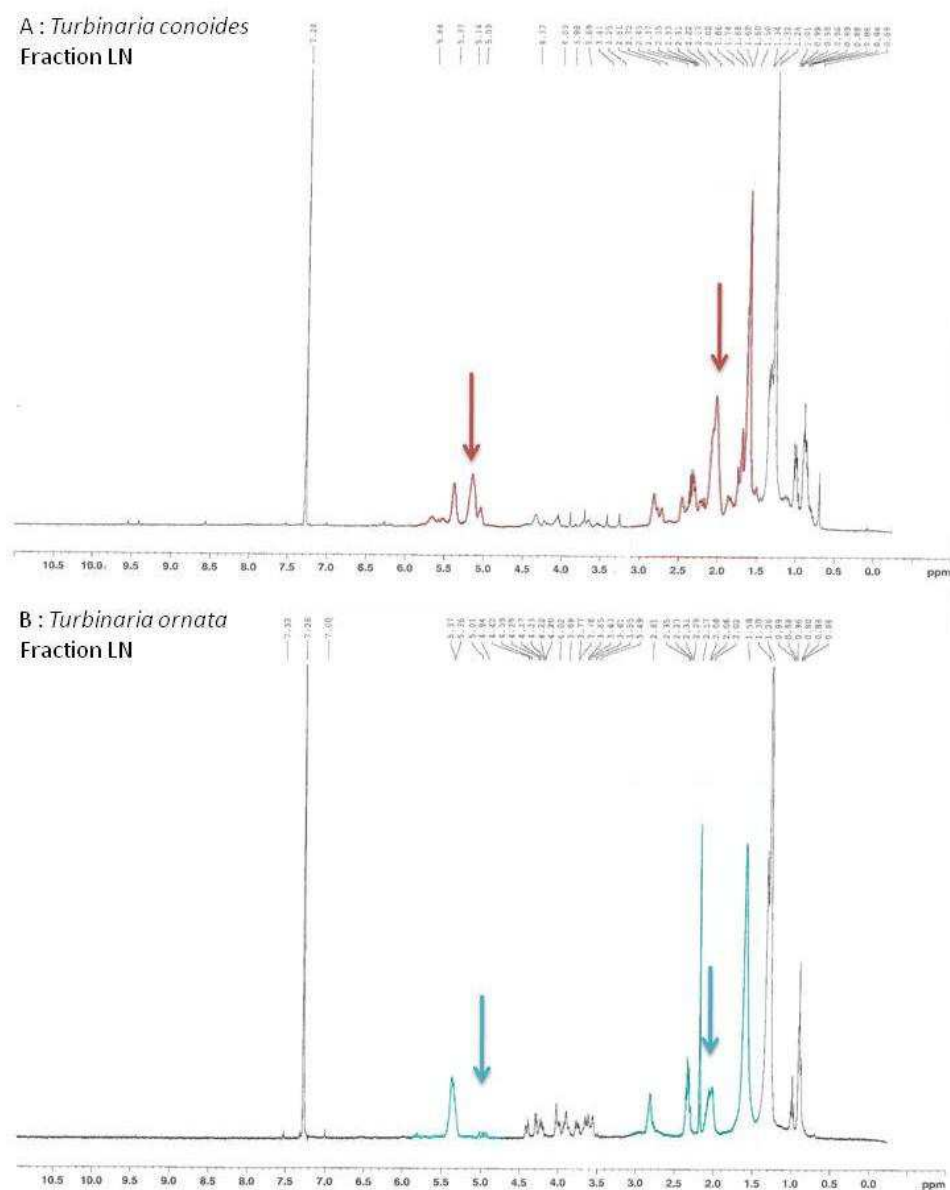


Figure 59 : Spectres RMN des fractions LN (Lipides Neutres) des extraits apolaires de *Turbinaria conoides* (A) et *T. ornata* (B) de Nouvelle Calédonie (Ouiné). Les flèches indiquent les signaux distinctifs, les signaux en couleurs indiquent des zones présentant des différences discriminantes.

Néanmoins, les analyses en CCM 1D (protocole I) de cette fraction LN ont révélé la présence de glycolipides mis en évidence par l'orcinol (icône ● sur la Figure 60) et par la diphénylamine (icône ■ sur la Figure 60). Il est étonnant de retrouver de tels composés dans cette fraction LN : elle n'a donc pas été correctement purifiée.

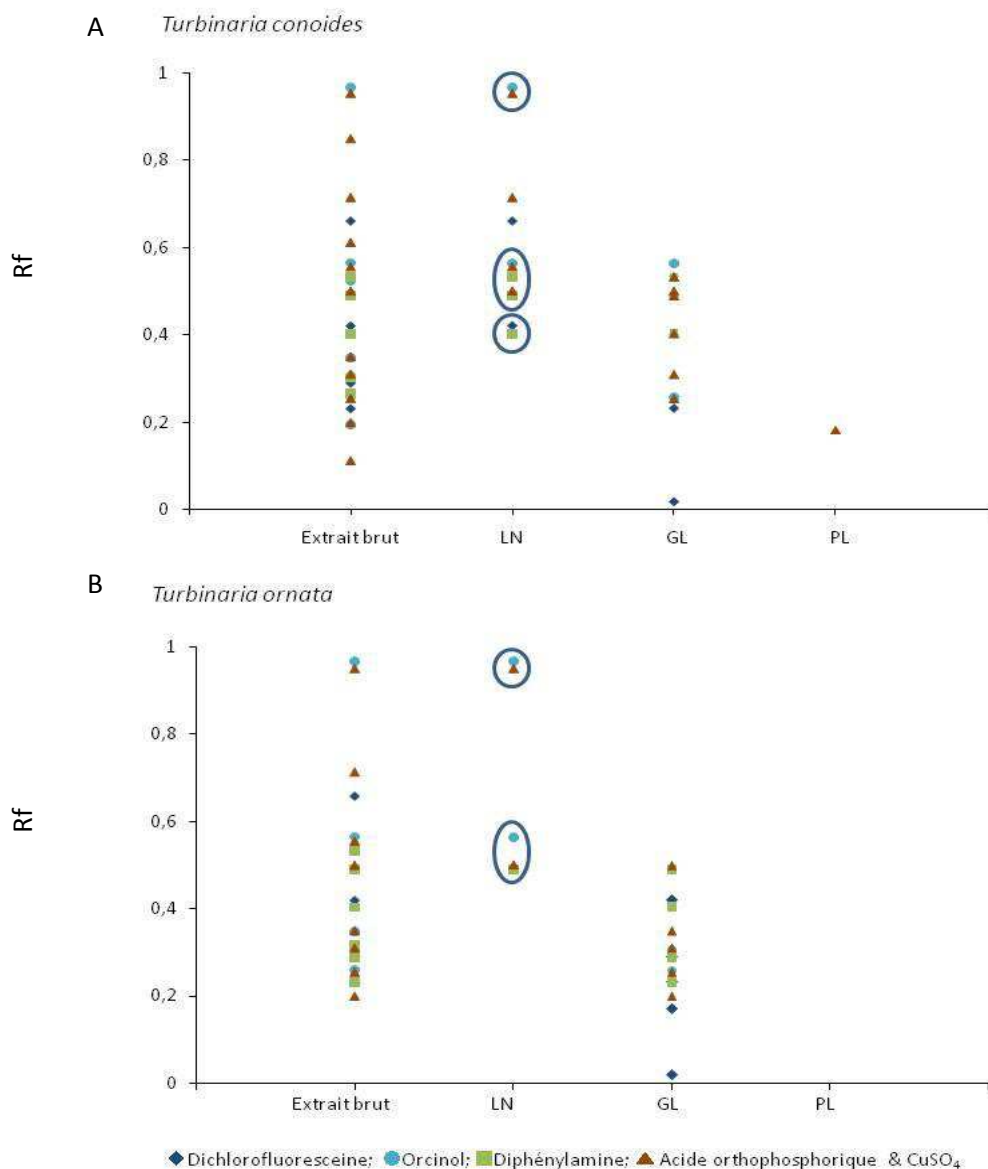


Figure 60 : Résultats obtenus en CCM selon le protocole I des extraits bruts et des fractions de *Turbinaria conoides* (A) et *T. ornata* (B) de Nouvelle Calédonie (Ouiné). LN : Lipides Neutres, GL : Glycolipides et PL : Phospholipides. Les spots des fractions LN entourés présentent des glycolipides révélés à l'orcinol (icône ●) et à la diphénylamine (icône ■).

Cette analyse CCM a donc montré que le premier fractionnement des extraits bruts, ayant donné lieu à l'obtention de trois fractions (LN, GL et PL), n'a pas permis de produire des fractions pures. C'est pourquoi, nous avons choisi de purifier la fraction LN (fraction montrant des différences significatives de signaux en RMN entre les deux espèces sœurs) en utilisant le même protocole de séparation des classes de lipides. L'analyse en ^1H -RMN des sous-fractions obtenues, notées LN-LN, LN-GL et LN-PL, ne présentent plus les différences de signaux préalablement observées (Annexe III-3).

1.3.6. Nouvelles Analyses CCM des extraits bruts de *Turbinaria ornata* et *T. conoides* de Nouvelle Calédonie (Ouiné) (Démarche B)

Les résultats de cette étude font l'objet d'un manuscrit en préparation, qui va être soumis à **Biochemical Systematics and Ecology**. La référence de cet article, présenté p. 204, est :

Le Lann K, Kervarec N, Cerantola S, Ioannou E, Roussis V, Kraffe E, Payri CE & V Stiger-Pouvreau (à soumettre) Identification of turbinaric acid in the brown alga *Turbinaria conoides* (J. Agardh) Kützinger from South Pacific islands and its chemotaxonomic significance. Biochemical Systematics and Ecology

En résumé, nous avons identifié un spot CCM permettant de différencier *Turbinaria conoides* et *Turbinaria ornata* en provenance d'Ouiné (Nouvelle Calédonie). Ce spot révélait des acides gras chez *T. ornata* et de l'acide turbinarique chez *T. conoides*. Suite à ces résultats, nous avons recherché la présence de l'acide turbinarique au sein des autres échantillons de *Turbinaria* en notre possession. Cela nous a permis de confirmer le caractère chimiomarqueur de ce composé.

Afin d'apporter un supplément d'information, les résultats portant sur l'identification de spot CCM et sur la recherche de l'acide turbinarique au sein des divers échantillons de *Turbinaria* étudiés ont été présentés plus en détails ci-après (§ 1.3.6.1 - Analyses CCM et RMN, p. 213 et § 1.3.7 - Recherche de l'acide turbinarique au sein des échantillons du genre *Turbinaria*, p.214)

Identification of turbinaric acid in the brown alga *Turbinaria conoides* (J. Agardh) Kützinger from South Pacific islands and its chemotaxonomic significance

Klervi Le Lann^{1,2}, Nelly Kervarec^{1,3}, Stéphane Cerantola^{1,3}, Efstathia Ioannou⁴, Vassilios Roussis⁴, Edouard Kraffe^{1,5}, Claude Payri⁶, Valérie Stiger-Pouvreau^{1,2}

¹ European University of Brittany (Université Européenne de Bretagne), France

² LEBHAM EA 3877, European Institute for Marine Sciences, University of Western Brittany, European University of Brittany (Université Européenne de Bretagne), Technopôle Brest-Iroise, 29280 Plouzané, FRANCE.

³ Résonance Magnétique Nucléaire-Résonance Paramagnétique Electronique, 6 avenue, Victor-Le-Gorgeu-CS93837, 29238 Brest Cedex 3, France

⁴ University of Athens, School of Pharmacy, Department of Pharmacognosy and Chemistry of Natural Products, Parepsitimiopolis Zografou, Athens 157 71, Greece

⁵ Laboratoire de Chimie, Electrochimie Moléculaires et Chimie Analytique, UMR 6521, 6 avenue, Victor-Le-Gorgeu-CS93837, 29238 Brest Cedex 3, France

⁶ UMR 7138 "Systématique, Adaptation, Evolution", IRD, B.P. A5, 98848, Nouméa Cedex, Nouvelle-Calédonie & UPF, French Polynesia

Corresponding author: Klervi Le Lann – klervi.lelann@gmail.com

Keywords: *Turbinaria conoides*, *Turbinaria ornata*, Turbinaric Acid, Chemomarker

Subject and Source

Turbinaria is a widespread tropical genus within the Phaeophyceae. It is relatively species-poor, with so far only 17 species having been described and assigned to the genus (Wynne 2002). However, the web site AlgaeBase lists 54 species names, of which 22 are actually flagged as current (Guiry and Guiry 2009). In the Indo-Pacific region, *Turbinaria ornata* and *Turbinaria conoides* are currently recorded. Nevertheless, both species display great morphological variations which can generate identification ambiguities, especially when looking at the shape of the leaf blades (Rohfritsch *et al.*, 2007). The aim of this study is an investigation of the chemical difference between both *Turbinaria ornata* and *Turbinaria conoides* in order to find potential chemomarkers. The material used in this investigation was collected during the austral winter from different regions of the South Pacific.

Previous work

Despite the limited number of *Turbinaria* species, this genus is morphologically complex. Several authors recognized a wide variety of forms (Wynne, 2002) (for review). This plasticity is correlated with habitat in response to environmental conditions (Wynne, 2002, De Senerpont Domis *et al.*, 2003, Koehl *et al.*, 2003). Various studies on *T. ornata* have shown the effect of hydrodynamism on the thallus morphology, the buoyancy and the phenological plasticity (Payri, 1984, Stiger and Payri, 1999, Stewart, 2004, Stewart, 2006). Despite this high phenological variability, the morphological species concept remains the basis for algal taxonomy (Wattier and Maggs, 2001), including the genus *Turbinaria* (Wynne, 2002) for which the shape of the leaf is one of the major taxonomical criteria to tell the species apart (Taylor, 1964, Wynne, 2002, Rohfritsch *et al.*, 2007). Because of the complex morphological variations, this criterion may be a source of confusion in identifications, and morphological classifications need to be improved by molecular studies (Rohfritsch *et al.*, 2007). However these tools depend on the nature of the biological material, i.e. buds or reproductive organs for DNA extraction, and the availability of good genetic markers, these studies can be long, difficult and expensive, especially since *T. ornata* and *T. conoides* are two closely related sister species (Rohfritsch *et al.*, 2007). In this context, high-resolution magic angle spinning (HRMAS) NMR spectroscopy, a recent non-invasive technique, had been considered as a promising analytical method to discriminate between the species concerned (Le Lann *et al.*, 2008). In this previous study, the usefulness of HRMAS as an analytical tool to discriminate closely related macroalgal species of the genus *Turbinaria* was demonstrated for the first time. HRMAS NMR appears to be a quick and reliable method for discrimination and taxonomic studies, providing results analogous to those of standard analysis protocols in the case of the brown algal genus *Turbinaria*. Moreover, different signals between *T. conoides* and *T. ornata* on NMR spectra were observed in the characteristic domain of saturated and unsaturated fatty acids.

Present work

Turbinaria conoides and *T. ornata* were collected during the austral winter from different regions of the South Pacific as described in Table 1. Field-collected samples were freeze-dried and sent to the first author for chemotaxonomical analysis (this study and Le Lann *et al.*, 2008).

Non-polar extracts were constituted from a three-times extraction using 10g of each freeze-dried sample in 100 mL from a dichloromethane/methanol mixture (2/1, v/v). The extract was then filtered and the filter was rinsed with 10 mL of solvent of extraction. Sixty mL of 0.75 % NaCl was added. The extract mixture was stored 2 hours at 4°C and shielded from the light. After degassing, the organic phase was got back and the solvent was eliminated under diminished pressure. About 100 mg resulted dried extracts were obtained.

Only samples from Ouiné (New Caledonia) were used for chemomarkers investigations.

Thin Layer Chromatography (TLC) (Kieselgel 60F254, Merck) was performed in the separation process. Samples (50 mg) of *Turbinaria conoides* and *T. ornata* from Ouiné (New Caledonia) were deposited down the plate and separated using hexane/diethyl ether/acetic acid (80/20/2, v/v/v). A distinctive region positioned at $R_f = 0.26$ was taken off (fraction of about 5 mg).

The fraction of both species was analyzed by high resolution proton NMR and by Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC–MS) techniques. Before, GC-MS analysis, the fraction from *T. conoides* has been silylated with N-(trimethylsilyl)-imidazole (Merck).

The NMR analysis of the fraction of *T. ornata* has revealed some fatty acids (Figure 1) and the GC-MS analysis have permitted to obtain the fatty acids composition (Figure 2).

This fraction contained some palmitic acid (16:0) as major constituent, some myristic acid (14:0), oleic acid (18:1), palmitelaidic acid (16:1) and some stearic acid (18:0) as minor constituents (Table 2). The NMR analysis of the fraction of *T. conoides* (Figure 3) has revealed some fatty acids and another compound: the turbinaric acid also known as 4,8,13,17,21-pentamethyl-4,8,12,16,20-docosapentaenoic acid (Figure 4). Identification of this compound has been confirmed by GC-MS analysis of silylated fraction (Figure 5). The ^1H NMR and MS data of turbinaric acid identified in *T. conoides* were similar to those of turbinaric acid described by Asari *et al.* (1989) (Table 3). Indeed, the mass spectrum shows a signal at 439 and 472 m/z, which corresponds to the ionic species of the trimethylsilylated turbinaric acid. Since turbinaric acid was not eluted in the GC-MS analysis of the original sample, we used the NMR spectrum and through integration of the olefinic protons of the monounsaturated fatty acids, the olefinic protons of turbinaric acid, the methyls of the saturated and monounsaturated fatty acids, as well as the five of the six methyls of turbinaric acid, resonating at 1.57 ppm, we were able to estimate the ratio of monounsaturated, saturated and turbinaric acid as 56% of saturated acids like palmitic and myristic acids, 27% of monounsaturated acids like oleic and palmitelaidic acids and 16.5% of turbinaric acid.

^1H NMR analysis of crude non polar extracts of other *Turbinaria* samples allowed us to classify samples according to the presence/absence of turbinaric acid. Characteristic signals of this compound have only been found in *T. conoides* extracts (Table 4).

Chemotaxonomic significance

In our study, we identified turbinaric acid for the first time in the brown alga *T. conoides*. Whatever the geographical origin of samples, we never found this compound in *T. ornata*, whereas Asari *et al.* (1989) described turbinaric acid in this species. Nevertheless, *Turbinaria* genus is morphologically complex and *T. conoides* and *T. ornata* are two closely species (Rohfritsch *et al.*, 2007). Moreover, leaf morphology, one of the major taxonomical criteria used to separate *Turbinaria* species, may be a source of systematic confusion rather than a diagnostic tool (Rohfritsch *et al.*, 2007). In this way, Asari *et al.* (1989) probably made a mistake in the identification of *T. ornata*. Thus, in the South Pacific region, we hypothesized that turbinaric acid is specific of *Turbinaria conoides*.

Acknowledgements

This study is part of the Ph.D. project carried out by the first author at IUEM (UBO), within the Laboratory of Ecophysiology and Biotechnology of Halophytes and Marine algae (LEBHAM EA 3877). This research was supported in part by a Coral Reef Initiative for South Pacific (CRISP) Programme and by the French Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MENESR). The authors sincerely thank Pr. Claude Payri and colleagues from IRD Nouméa (New Caledonia), for the collection and conditioning of the seaweed samples from Solomon Islands, New Caledonia and Fiji Islands. Additional thanks are addressed to Dr. Stéphane Pouvreau (Ifremer, Plouzané, France) for the collection and conditioning of the seaweed samples from Tahiti, French Polynesia.

References : Voir la partie Bibliographie en p.301

Tables Captions

Table 1: List of species and sampling data of *Turbinaria* species used in the present study.

Table 2: Fatty acids composition of the fraction isolated from *Turbinaria ornata* (Ouiné, New Caledonia). RT : GC-MS retention times.

Table 3: ^1H NMR chemical shifts of turbinaric acid.

Table 4: Research for the turbinaric acid within samples collected in the South Pacific

Figures Captions:

Figure 1: ^1H NMR spectrum of the fraction isolated from *Turbinaria ornata* (Ouiné, New Caledonia). The attributions of the characteristic data of fatty acids are represented in colors as well as characteristic peak of the solvent (deuterated chloroform).

Figure 2: GC-MS spectrum of the fraction isolated from *Turbinaria ornata* (Ouiné, New Caledonia)

Figure 3: ^1H NMR spectrum of the fraction isolated from *Turbinaria conoides* (Ouiné, New Caledonia). The attributions of the characteristic data of turbinaric acid are represented in colors.

Figure 4: Chemical representation of a molecule of Turbinaric acid

Figure 5: GC-MS spectrum of the silylated fraction isolated from *Turbinaria conoides* (Ouiné, New Caledonia).

Table 1: List of species and sampling data of *Turbinaria* species used in the present study.

Archipelagos	Locality	Sample Date	Species
Solomon Islands	Anuta Paina Island	18/07/2004	<i>Turbinaria ornata</i>
	Lau Lagoon	17/07/2004	<i>T. conoides</i>
	Nggela NW	12/07/2004	<i>T. conoides</i>
New Caledonia	Prony 2	12/06/2007	<i>T. ornata</i>
	Ouiné	26/03/2006	<i>T. ornata</i> <i>T. conoides</i>
Fiji Islands	Vanua Levu (Kakaulevu reef)	15/05/2007	<i>T. ornata</i>
French Polynesia	Tahiti	11/2008	<i>T. ornata</i>

Table 2: Fatty acids composition of the fraction isolated from *Turbinaria ornata* (Ouiné, New Caledonia). RT : GC-MS retention times.

RT (min)	Compounds (fatty acids)	%
41.94	myristic (tetradecanoic) acid	12.64
47.87	palmitelaidic (9-trans-hexadecenoic) acid	5.65
48.69	palmitic (hexadecanoic) acid	68.84
53.90	oleic (9-cis-octadecenoic) acid	8.77
54.73	stearic (octadecanoic) acid	1.81

Table 3: ^1H NMR chemical shifts of turbinaric acid.

	H	CDCl_3 (500 MHz)		C_6D_6 (500MHz) ^a	
CH_2	2	2.40 ppm	Triplet	2.35	Multiplet
CH_2	3	2.22 ppm	Triplet	2.25	Multiplet
CH_3	22, 23	1.68 ppm	Singulet	1.54 -	Singulet
	24,25,26,27	1.60 ppm	Singulet	1.75	
CH	5,9,12,16,20	5.13 ppm	Multiplet	5.26 , 5.32	Multiplet
CH_2	6,7,10,11,14,15,18,19	2.00 ppm	Singulet	2.15	Singulet

^a ^1H NMR data of Asari *et al.*, 1989, added for comparison

Table 4: Research for the turbinaric acid within samples collected in the South Pacific

Archipelagos	Locality	Species	Turbinaric acid (characteristic signals in ^1H NMR)
Solomon Islands	Anuta Paina Island	<i>Turbinaria ornata</i>	No
	Lau Lagoon	<i>T. conoides</i>	Yes
	Nggela NW	<i>T. conoides</i>	Yes
New Caledonia	Prony 2	<i>T. ornata</i>	No
Fiji Islands	Vanua Levu (Kakaulevu reef)	<i>T. ornata</i>	No
French Polynesia	Tahiti	<i>T. ornata</i>	No

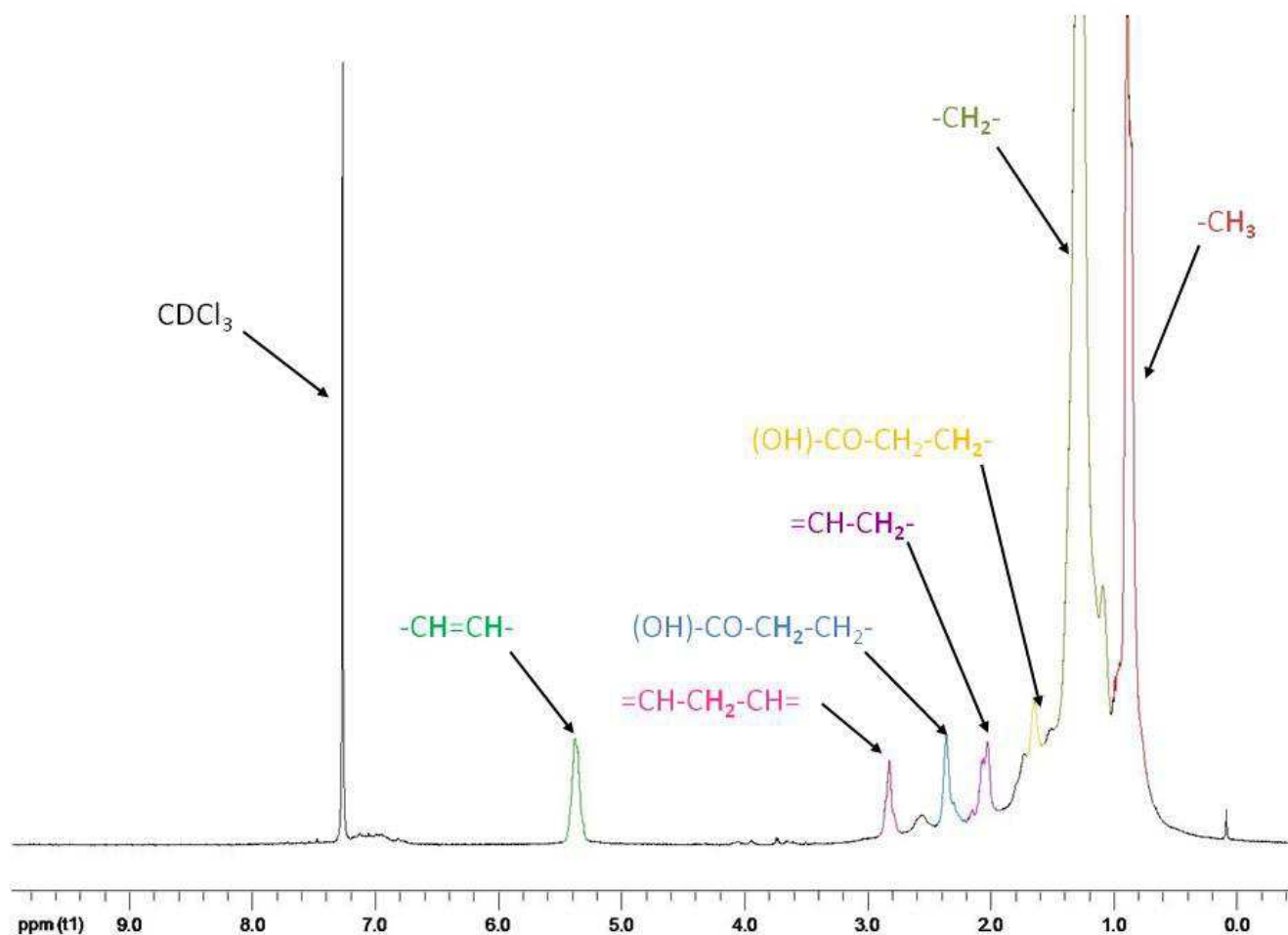


Figure 1: ^1H NMR spectrum of the fraction isolated from *Turbinaria ornata* (Ouiné, New Caledonia). The attributions of the characteristic data of fatty acids are represented in colors as well as characteristic peak of the solvent (deuterated chloroform).

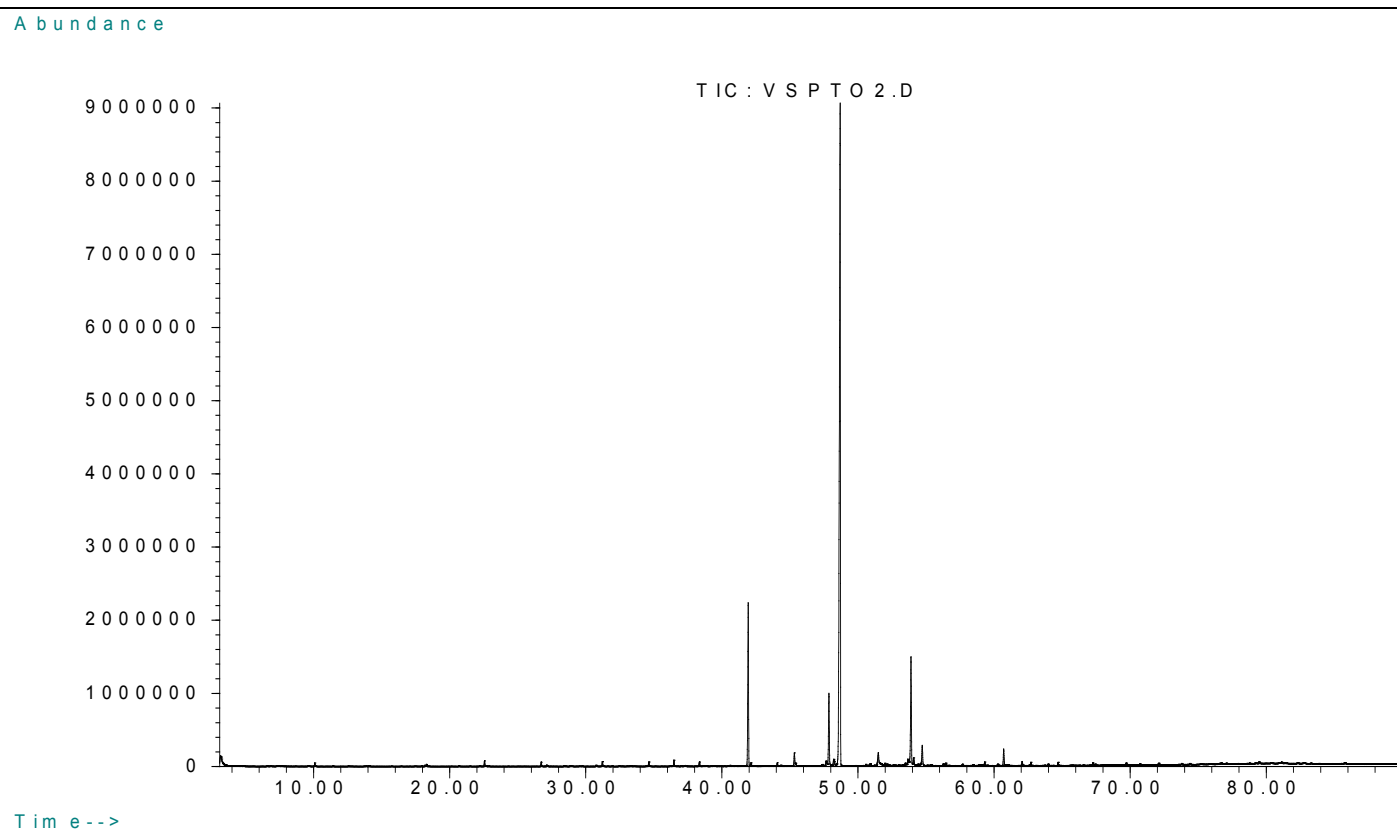


Figure 2: GC-MS spectrum of the fraction isolated from *Turbinaria ornata* (Ouiné, New Caledonia)

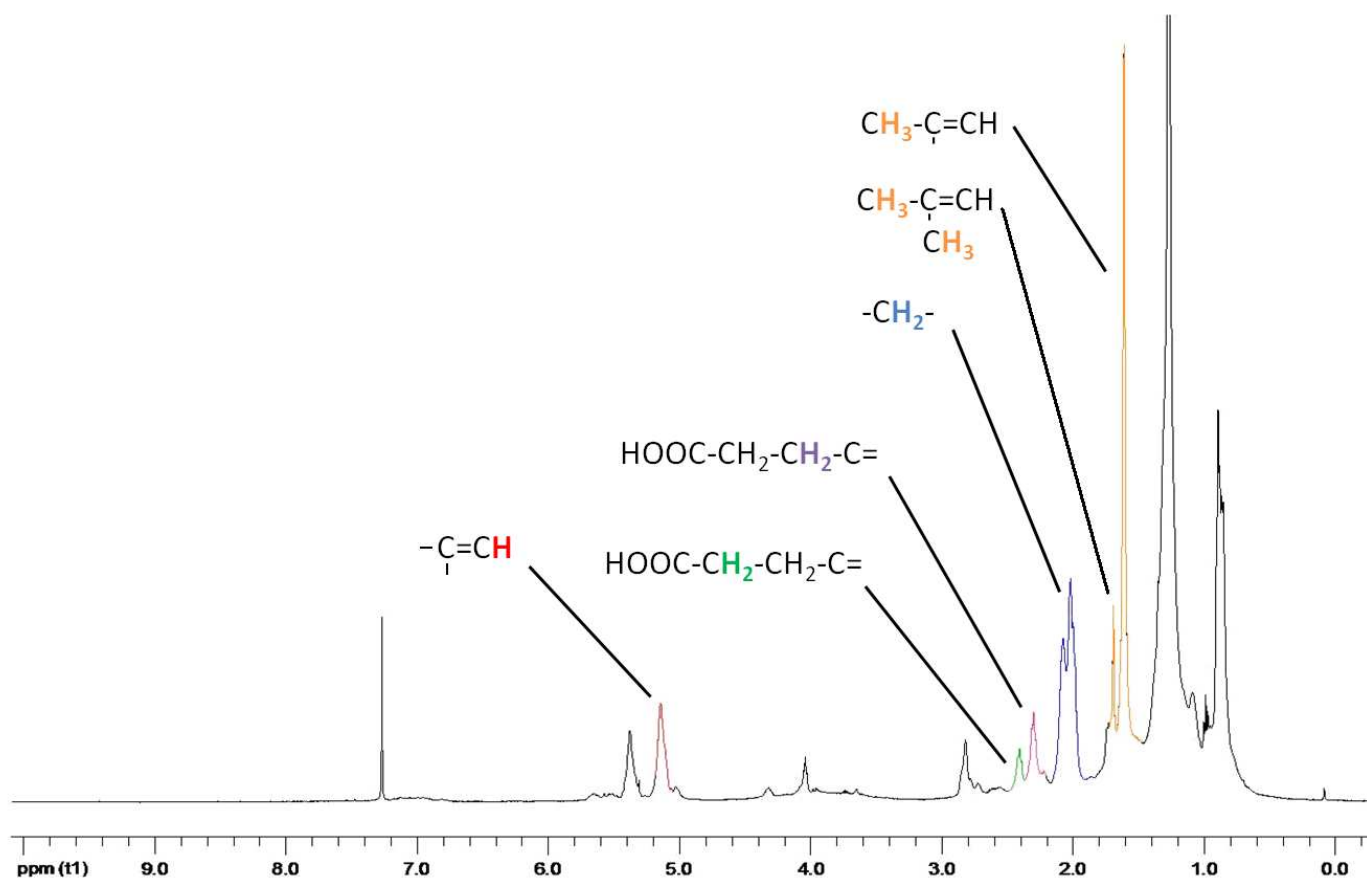


Figure 3: ^1H NMR spectrum of the fraction isolated from *Turbinaria conoides* (Ouiné, New Caledonia). The attributions of the characteristic data of turbinaric acid are represented in colors.

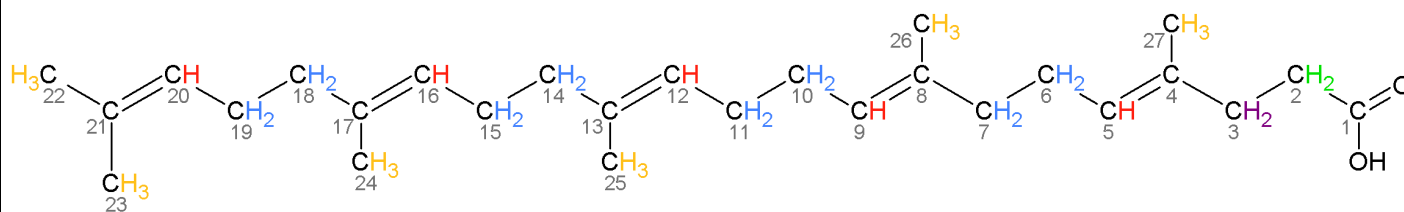


Figure 4: Turbinaric acid (4, 8, 13, 17, 21-pentamethyl-4, 8, 12, 16, 20-docosapentaenoic acid) with colors representative of NMR signals (cf. Figure 3)

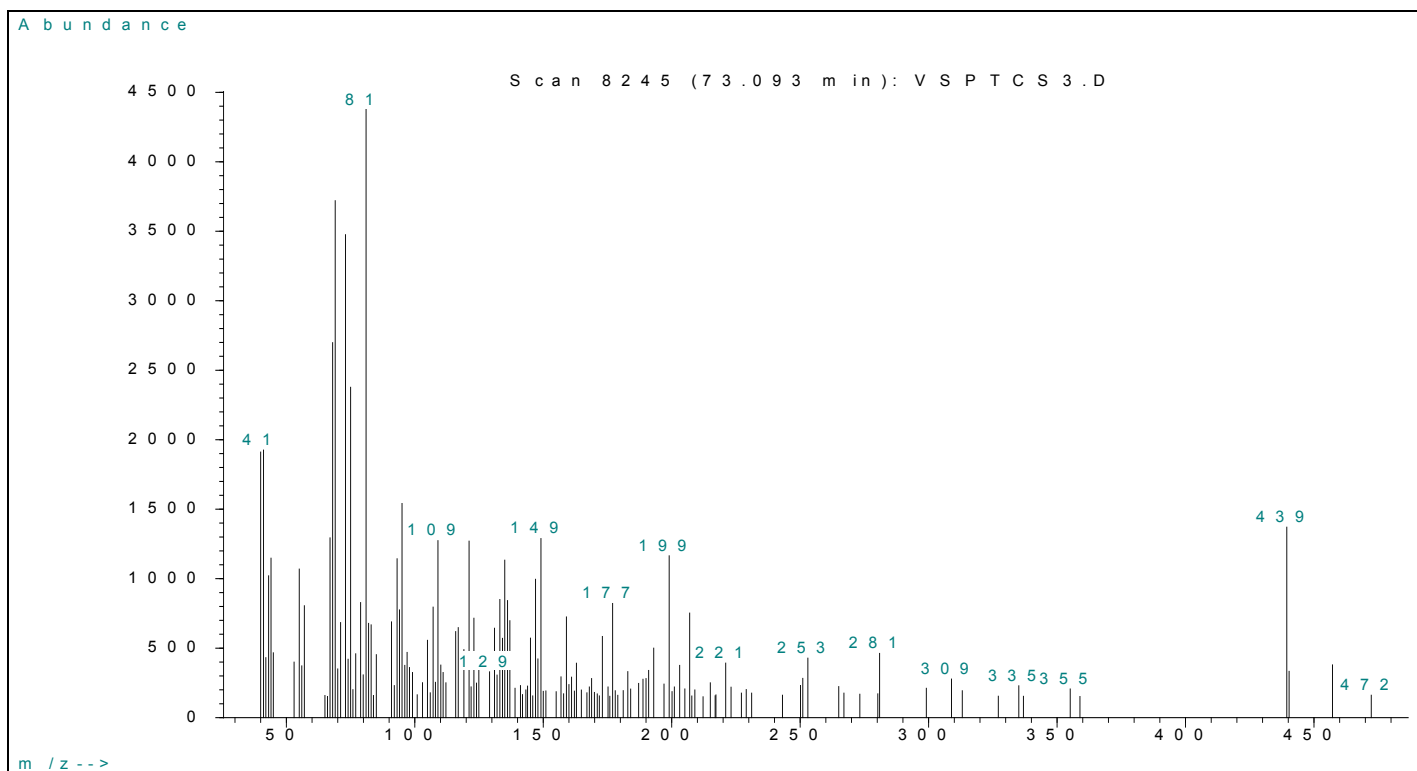


Figure 5: GC-MS spectrum of the silylated fraction isolated from *Turbinaria conoides* (Ouiné, New Caledonia).

1.3.6.1. Analyses CCM et RMN

Les protocoles I et II ont été utilisés et comparés (Figure 61) pour cette deuxième investigation en CCM. Dans les deux cas, seuls deux systèmes de révélation ont été utilisés : la détection par lampe UV et la révélation par le couple « acide orthophosphorique/CuSO₄ ». Des spots discriminants ont pu être observés dans les deux cas (Figure 61). Cependant, seul le protocole II a été choisi pour le prélèvement des spots intéressants car l'élution y est plus rapide. Les spots sélectionnés sont notés Tc-CCM-3 et To-CCM-3.

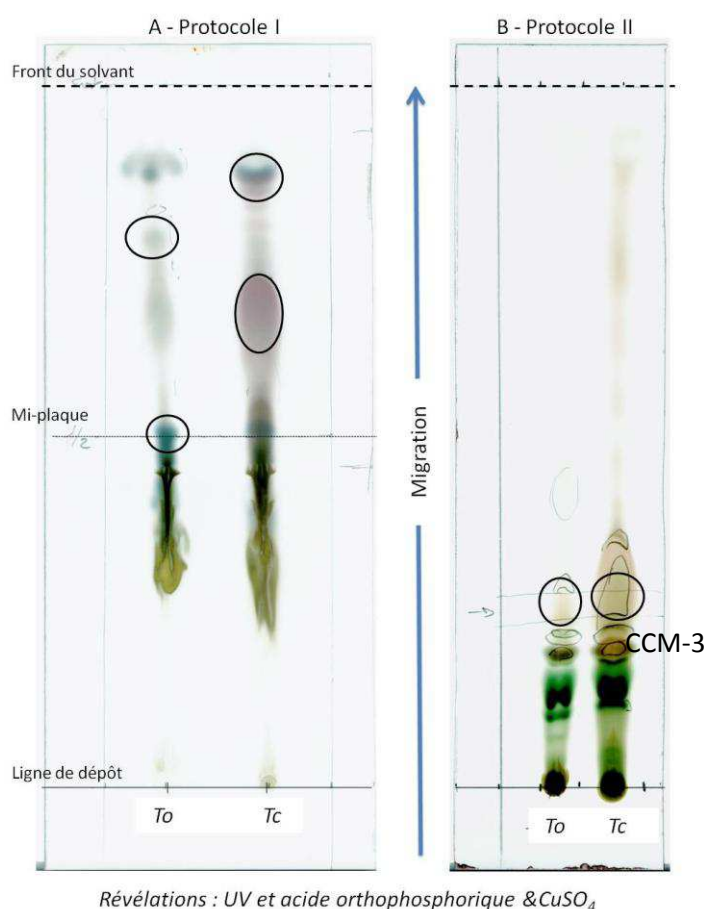


Figure 61 : Comparaison de la migration d'extraits de *Turbinaria conoides* (Tc) et de *T. ornata* (To) de Nouvelle Calédonie (Ouiné) en CCM selon le protocole I (A) et le protocole II(B) (cf. §1.2.5 - Analyses des extraits lipidiques en chromatographie sur couche mince, p.185).

Les analyses ¹H-RMN des spots CCM-3 discriminant les deux espèces ont permis d'observer des différences de signaux dans la zone entre 5,5 ppm et 5,0 ppm et dans celle entre 2,0 et 1,5 ppm (Figure 62). Tout comme pour les extraits bruts, *Turbinaria conoides* se distingue par la présence de deux signaux entre 5,5 ppm et 5,0 ppm (1 signal vers 5,2 ppm et 1 vers 5,35 ppm) et par des signaux à 1,58 et 2,0 ppm très importants, par rapport à ceux vers 2,3 ppm. *T. ornata* se distingue de *T. conoides* par un seul signal dans la

zone entre 5,5 ppm et 5,0 ppm (vers 5,3 ppm) et par des signaux à 1,58 et 2,0 ppm d'intensité similaire à ceux vers 2,3 ppm (Figure 62).

1.3.7. Recherche de l'acide turbinarique au sein des échantillons du genre *Turbinaria*

Suite aux résultats obtenus précédemment (cf. Le Lann *et al.* soumis), nous nous sommes demandé si cette différence de composition se retrouvait dans d'autres échantillons du genre *Turbinaria*. Nous avons donc recherché l'acide turbinarique au sein des autres échantillons du genre *Turbinaria* récoltés au cours de cette étude. Pour cela tous les échantillons de *Turbinaria* collectés dans le Pacifique Sud ont été utilisés et leur extraits lipidiques ont été analysés en ^1H RMN. L'étude de ces spectres RMN (Figure 63) a permis de déceler la présence ou l'absence de l'acide turbinarique au sein de ces échantillons.

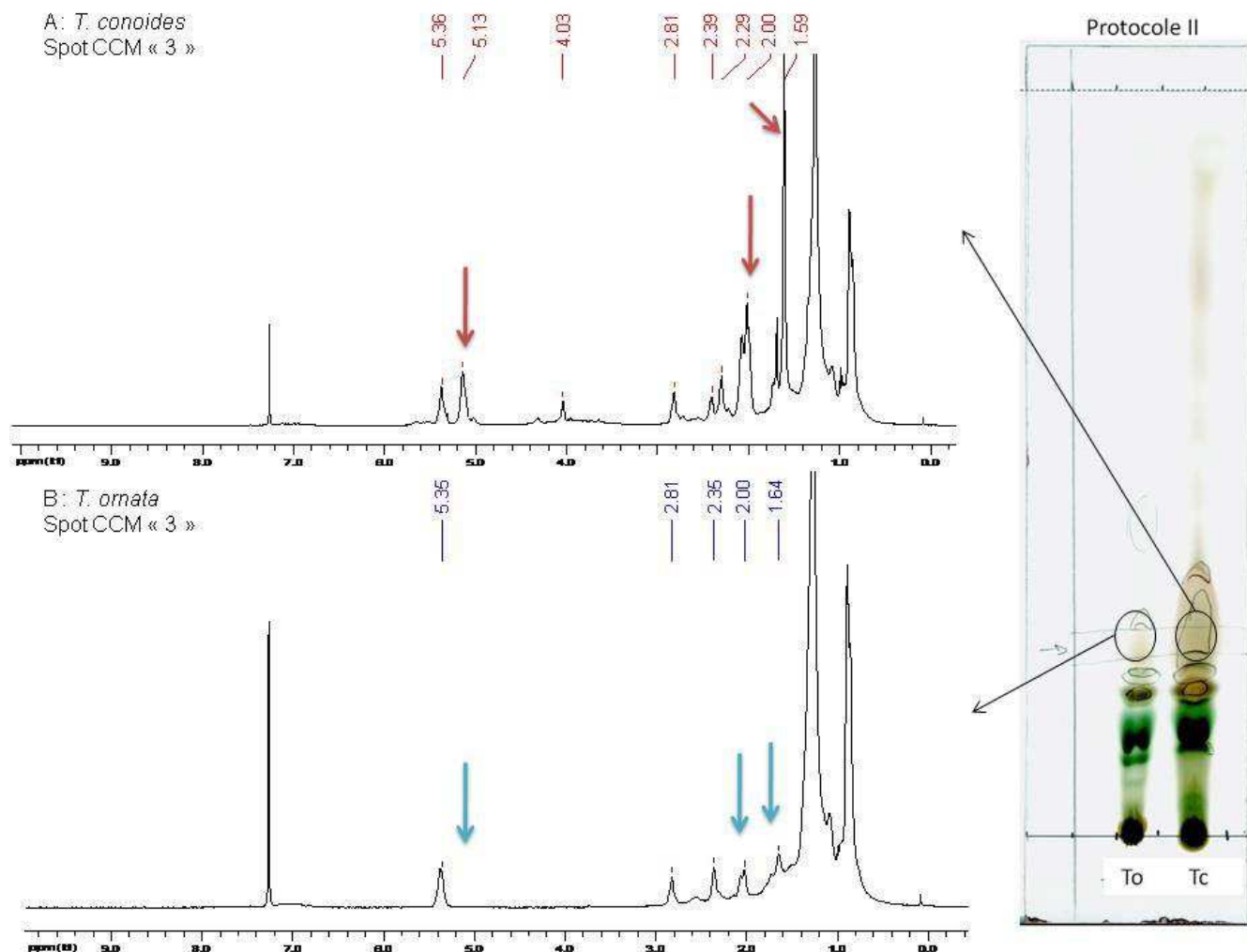


Figure 62 : Spectres ^1H -RMN des spots discriminants obtenus par Chromatographie sur Couche Mince selon le protocole II à partir des extraits bruts de *Turbinaria conoides* (Tc, A) et de *T. ornata* (To, B) de Nouvelle Calédonie (Ouiné). Les flèches indiquent les signaux discriminants.

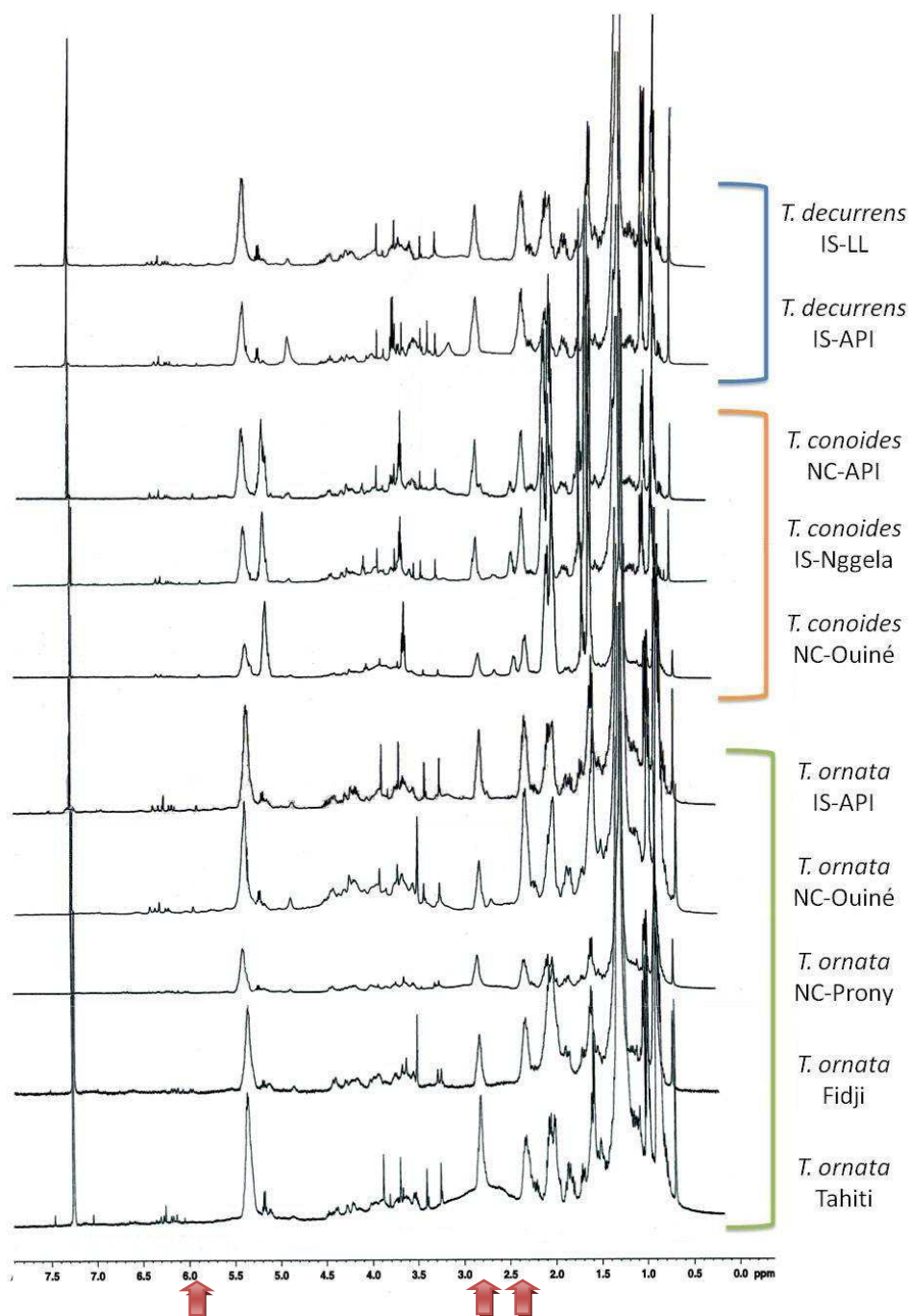


Figure 63 : Spectres RMN HR-MAS des 11 échantillons du genre *Turbinaria* récoltés au sein du Pacifique Sud. Tous les spectres ont été alignés sur le signal du CDCl_3 . Les flèches indiquent les déplacements chimiques caractéristiques de l'acide turbinarique. IS : îles Salomon, API : Anuta Paina Island, LL : Lau Lagoon, NC : Nouvelle Calédonie.

L'acide turbinarique est donc un marqueur chimiotaxonomique de *Turbinaria conoides* dans le Pacifique Sud

2. Etude chimiotaxonomique de *Bifurcaria bifurcata*

2.1. Etat de l'art et problématique

Depuis les années 1980, *Bifurcaria bifurcata* a fait l'objet de nombreuses études de phytochimie, incluant le suivi de variations géographiques de sa composition chimique (Valls *et al.* 1986, Valls *et al.* 1995, Culioli *et al.* 2004, El Hattab *et al.* 2008 et références ci-inclues). Ces études ont essentiellement porté sur des composés terpéniques, connus pour être des métabolites secondaires majoritaires chez certaines espèces de la famille des Sargassaceae. Parmi ces références, Valls *et al.* (1995) ont montré qu'il existait deux types chimiques le long des côtes bretonnes. Le premier **type chimique ou Type 1** est caractérisé par la présence d'**Eléganolone** comme composé diterpénoïde principal. Le second type chimique ou **Type 2** est caractérisé par la présence de **Bifurcane** (Figure 64) comme composé diterpénoïde majoritaire.

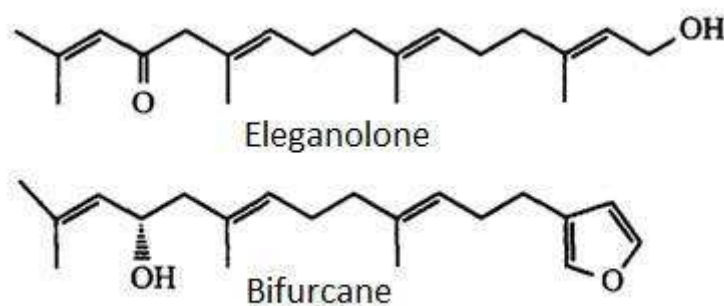


Figure 64 : Composés diterpénoïdes caractéristiques des types chimiques 1 (Eléganolone) et 2 (Bifurcane) de *Bifurcaria bifurcata* (d'après Valls *et al.* 1995).

Ces deux types chimiques ne sont pas présents dans un même individu et une même population de *Bifurcaria bifurcata*. Au contraire, ils se répartissent différemment suivant l'environnement (Valls *et al.* 1995). Ainsi, selon ces auteurs, le Type 1 est retrouvé dans deux zones géographiques : entre Piriac sur Mer et Melon et entre Lannion et le Cap de la Hague alors que le type 2 n'est retrouvé qu'entre Melon et Lannion (Figure 65).

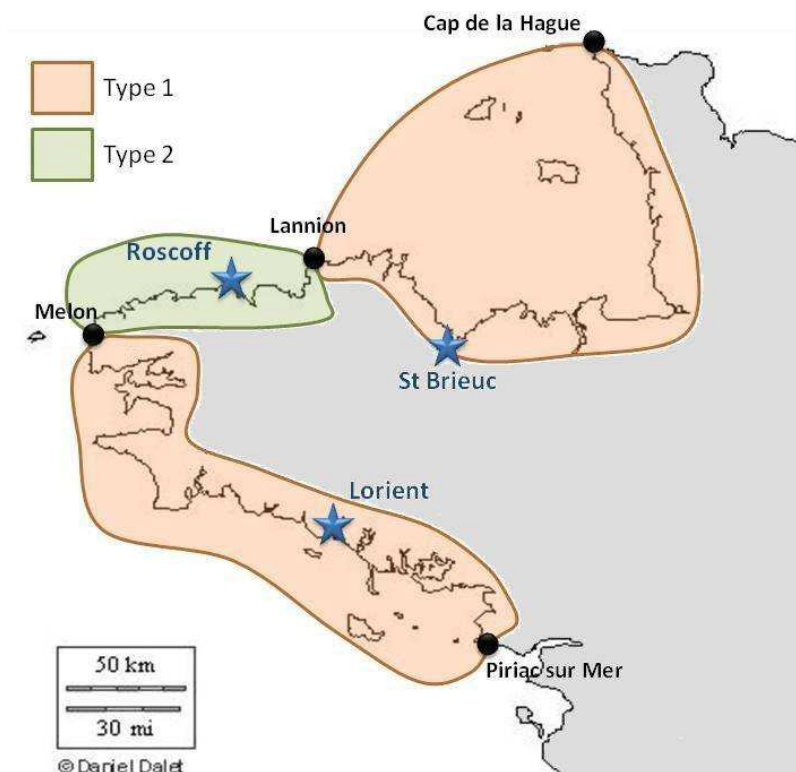


Figure 65. Répartition géographique des types chimiques 1 et 2 présents dans différentes populations de *Bifurcaria bifurcata* le long des côtes bretonnes, avec les étoiles représentant les sites de récoltes de l'étude de Valls *et al.* (1995).

Face à cette distribution des types chimiques estimée par Valls *et al.* (1995), nous nous sommes intéressées (1) à la **limite de répartition de ces deux types chimiques en Bretagne**, mais également (2) à la **recherche du paramètre environnemental qui conditionne la présence ou non d'un type chimique particulier**.

2.2. Matériels et Méthodes

2.2.1. Démarche expérimentale

La Figure 66 illustre de façon schématique les principales étapes qui nous ont permis (1) d'isoler des chimiomarqueurs au sein de *Bifurcaria bifurcata* et (2) de rechercher la limite géographique de la répartition et le facteur environnemental responsable de la répartition des types chimiques identifiés par Valls *et al.* (1995). Afin de caractériser les chimiomarqueurs associés aux types chimiques 1 et 2 et identifiés par Valls *et al.* (1995), nous avons préparé des extraits terpéniques à partir d'échantillons récoltés en Décembre 2006 à la Pointe du Diable et à Porsmeur, que nous avons analysé en RMN des solutions et en CCM. Suite à ces

analyses, nous avons sélectionné deux spots discriminant les deux sites (Porsmeur et la Pointe du Diable) que nous avons analysés en RMN et en LC-MS (Figure 66A).

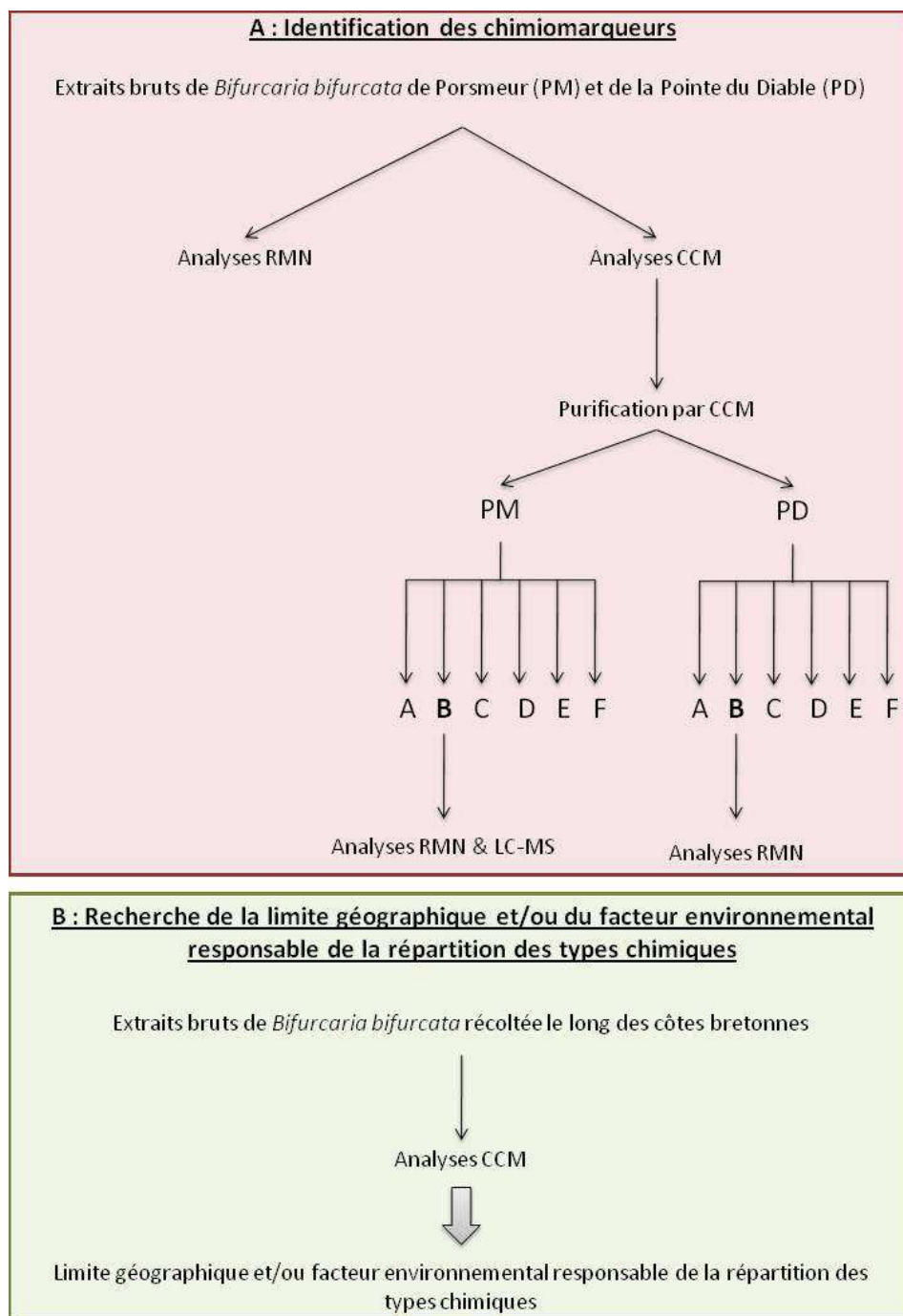


Figure 66 : Principales étapes de la démarche expérimentale menée lors de l'identification des chimiomarqueurs de *Bifurcaria bifurcata* (A) et de la recherche de la limite de répartition géographique et du facteur environnemental responsable de la répartition des types chimiques (B).

Afin de rechercher la limite géographique de la répartition des types chimiques et le facteur environnemental responsable de la présence/absence des types chimiques, nous avons récolté le long des

côtes de la Pointe bretonne (Finistère et Morbihan) divers échantillons de *Bifurcaria bifurcata*. Nous avons effectué des extraits terpéniques à partir de ces échantillons puis nous avons analysé ces extraits par CCM (Figure 66 , B).

2.2.2. Matériel biologique

Au cours de cette étude de chimiotaxonomie de *Bifurcaria bifurcata*, différents échantillons ont été traités. Il s'agit tout d'abord des échantillons récoltés en Décembre 2006 à la Pointe du Diable et à Porsmeur. Ces échantillons ont servi à l'identification des types chimiques de la Pointe du Diable et de Porsmeur. Puis divers échantillons de *Bifurcaria bifurcata* ont été récoltés en juillet 2009 dans divers sites le long des côtes du Finistère et du Morbihan (Tableau 13), dans le but de répondre au second objectif de cette étude, à savoir connaître la limite de répartition des types chimiques et le facteur environnemental responsable de la présence ou non d'un type chimique particulier.

Tableau 13 : Sites de prélèvement visités afin de récolter des échantillons de *Bifurcaria bifurcata* le long des côtes du Finistère et du Morbihan (du Nord au Sud).

Site	Substrat	Hydrodynamisme
Portsall	Sable	Abrité
Porsmeur	Sable	Abrité
Kerhornou	Roches	Battu
Blanc Sablons	Roches	Battu
Trez-Hir	Roches	Battu
Pointe du Diable	Roches	Battu
Kador	Sable majoritaire	Semi- abrité
Pors Lesven	Roches	Battu
Pors Théolen	Roches	Battu
Le Loc 'h	Sable majoritaire	Semi- abrité
Saint Guénolé	Roches	Battu
Saint Pierre	Roches	Semi- abrité
Fort Bloqué	Roches	Semi- abrité

Les sites visités sont, du Nord au Sud, de Portsall, Porsmeur, Kerhornou (commune de Ploumoguier), les Blanc-Sablons (commune du Conquet), le Trez-Hir (commune de Plougoulin), la Pointe du Diable (commune de Plouzané), le Kador (commune de Crozon-Morgat), Pors-Leven (commune de Lesven), Pors

Théolen (Commune de Cleden-Cap-Sizun), Le Loc'h (Commune de Plogoff), Saint Guénolé (Commune de Penmarc'h), Saint Pierre (Commune de Penmarc'h) et Fort Bloqué (Commune de Ploemeur) (Figure 67).



Figure 67 : Emplacement géographique des sites de récolte des échantillons de *Bifurcaria bifurcata* le long des côtes du Finistère et du Morbihan en Juillet 2009 (image Google Earth).

Ces sites se distinguent par la nature du substrat, le mode d'hydrodynamisme mais également par les masses d'eau. En effet, les sites de :

- Portsall et de Posmeur sont situés en Manche,
- Kerhornou, les Blancs sablons le Trezhir et Pors Théolen se trouvent en Mer d'Iroise
- Pointe du Diable est située en rade de Brest
- Les sites du Kador et de Pors Leven en Baie de Douarnenez
- Le Loc'h, Saint Guénolé et Saint Pierre sont situés dans l'Océan Atlantique
- Le site de Fort Bloqué est situé dans le golfe du Morbihan

2.2.3. Extraction

Les terpènes sont extraits selon le protocole modifié d'après Culioli (Jegou, comm. pers.).

Ainsi, 5 g d'algues lyophilisées sont extraits avec 100 mL d'un mélange de solvant dichlorométhane:méthanol (2:1, v:v) via un broyage à l'ultraturax. L'ensemble est ensuite homogénéisé puis soumis aux ultrasons durant 15 min. Après filtration sur coton de verre, le solvant est éliminé par évaporation rotative (température du bain-marie < 35°C). L'extrait est repris dans 5 mL de solvant d'extraction et conservé au congélateur (-25°C).

En vue de purifications ultérieures, les extraits de *Bifurcaria bifurcata* récoltés en Décembre 2006 à la Pointe du Diable et à Porsmeur ont été effectués à partir de 10 g de matière sèche et de 200 mL de solvant d'extraction.

2.2.4. Analyses par chromatographie sur couche mince

Les extraits terpéniques des échantillons de *Bifurcaria bifurcata* récoltés en Décembre 2006 à la Pointe du Diable et à Porsmeur et ceux récoltés en Juillet 2009 ont été analysés par chromatographie sur couche mince (CCM) selon le protocole II (cf. §1.2.5 - Analyses des extraits lipidiques en chromatographie sur couche mince, p.185), le solvant d'élution utilisé est un mélange constitué d'hexane:diéthyle éther:acide acétique glacial (80:20:2, v:v:v) (Tableau 11, p.186). Le révélateur est le complexe acide orthophosphorique/sulfate de cuivre (Annexe III-2).

2.2.5. Analyses par RMN des solutions

Les extraits et les fractions (spots) ont été repris dans du CDCl₃. Les spectres RMN du proton des extraits bruts ont été obtenus à partir d'un spectromètre BRUKER DRX 400 (400 MHz) alors que les spectres RMN du carbone et les expérimentations 2D ont été effectués sur un spectromètre BRUKER DRX Advance 500 (500 MHz) (Service commun RPE-RMN, UBO).

2.2.6. Analyses par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse

Les analyses par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) ont été réalisées au laboratoire MAPIEM (Matériaux-Polymères-Interface Environnement Marin) selon le protocole ECIMAR décrit à la Figure 68.

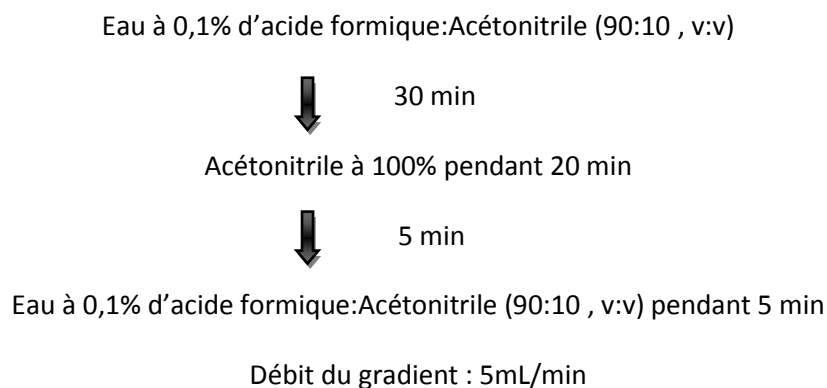


Figure 68 : Protocole de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) (d'après le protocole utilisé dans le projet ECIMAR) utilisé lors de l'analyse des spots discriminants de *Bifurcaria bifurcata* récoltée à Porsmeur et à la Pointe du Diable.

Les appareillages et techniques utilisés sont les suivants :

- LC-MS : Elite LaChrom (VWR) couplée à Esquire 600 (Bruker) opérant en mode EI à 70 eV
- Colonne HPLC : Phénomenex Gemini 5u C6-phényl 110 A, 250 x 3. 00 mm, 5 µm chauffée à 30°C.

2.2.7. Analyses statistiques

Les données obtenues par CCM ont été soumises à une analyse statistique. Le logiciel Statsoft Statistica 8.0 pour Windows a été utilisé pour exécuter les tests. La procédure statistique utilisée dans cette étude est basée sur une analyse en composantes principales (ACP) qui permet d'illustrer les différences observées en CCM. L'ACP a été effectuée avec tous les échantillons analysés en CCM. Les variables utilisées pour effectuer cette analyse statistique sont l'allure du profil (c'est-à-dire l'intensité des spots observés) pour chaque échantillon analysé par CCM.

2.3.Résultats

2.3.1. Identification de chimiomarqueurs chez *Bifurcaria bifurcata* récoltés à la Pointe du Diable et à Porsmeur

2.3.1.1. Analyses RMN et CCM des extraits bruts

Les spectres ^1H RMN des extraits bruts terpéniques issus d'échantillons de *Bifurcaria bifurcata* récoltés en Décembre 2006 à Porsmeur et à la Pointe du Diable sont présentés à la Figure 69. Ces spectres montrent des différences significatives dans les régions suivantes : de 7,25 ppm, entre 6,5 et 4,0 ppm, entre 3,0 et 2,5 ppm et de 2,0 ppm.

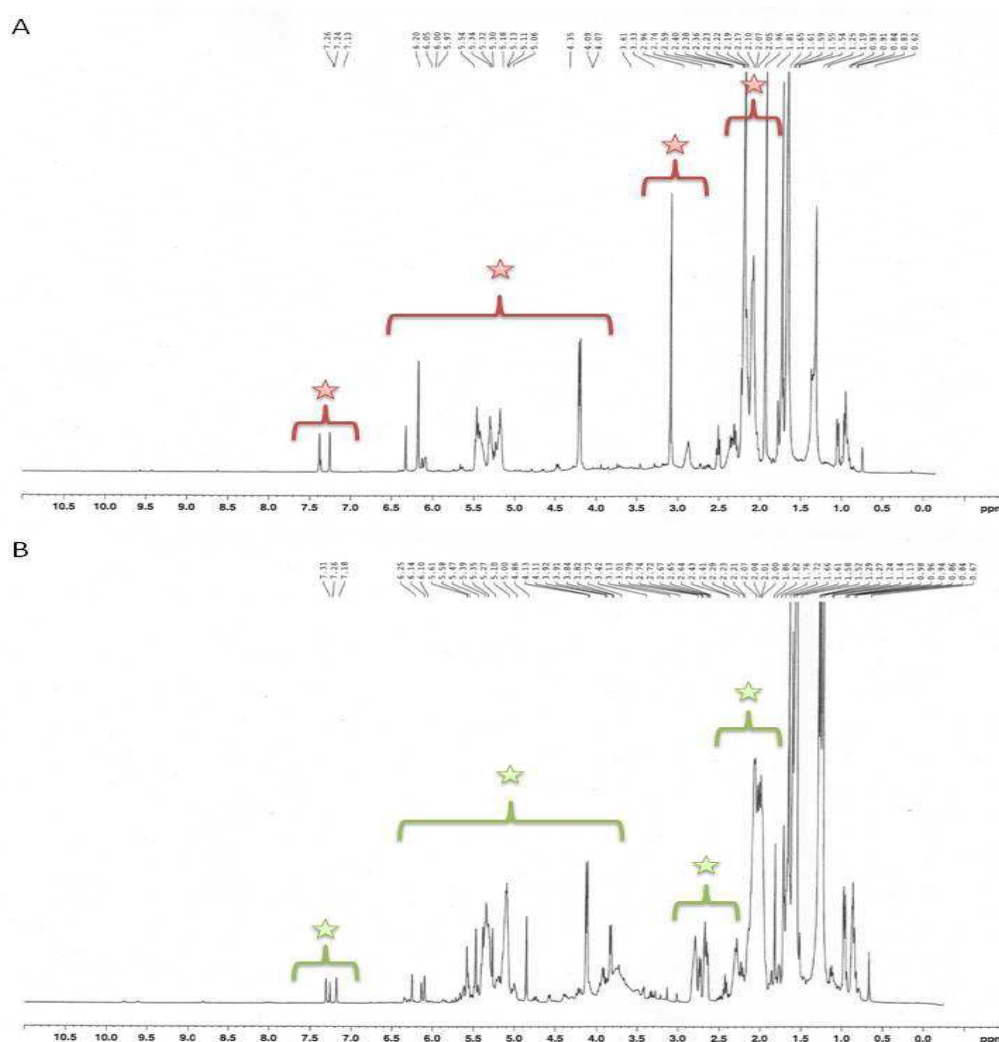


Figure 69 : Spectres ^1H RMN des extraits terpéniques de *Bifurcaria bifurcata* récoltée en Décembre 2006 à Porsmeur (A) et à la Pointe du Diable (B). Les étoiles signalent les zones différentes entre les deux spectres.

Suite à ces analyses, nous avons analysé ces deux extraits en CCM. Nous avons ainsi pu identifier 3 spots distinguant les deux sites, comme le montre la Figure 70, avec les différents Rf des spots discriminants : 0,85, 0,62 et 0,30.

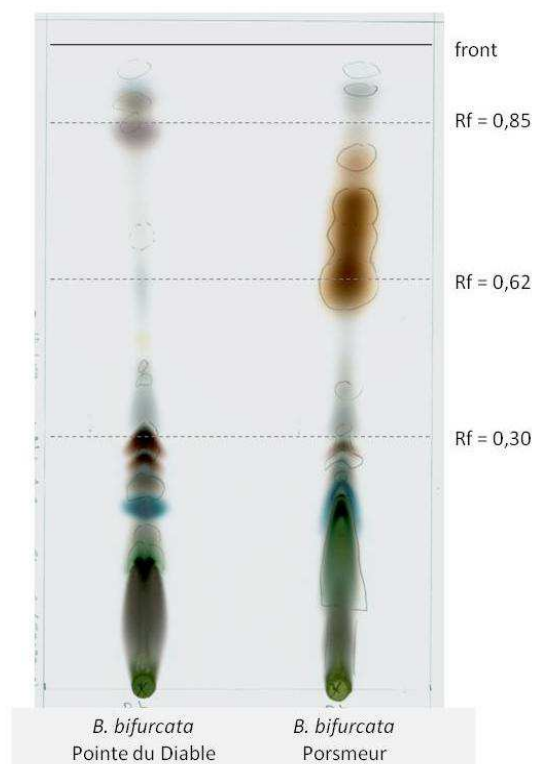


Figure 70 : Analyse par CCM des extraits bruts terpéniques issus de *Bifurcaria bifurcata* récoltée en Décembre 2006 à la Pointe du Diable et à Porsmeur.

2.3.1.2. Analyses des spots discriminants par RMN

Parmi les spots distinguant l'extrait terpénique de *Bifurcaria bifurcata* collectée à Porsmeur de celui obtenu d'échantillons collectés à La Pointe du diable, c'est le spot B (Rf de 0,62) qui a été sélectionné et qui a ensuite été analysé par ^1H RMN. Les résultats obtenus sont résumés à la Figure 71.

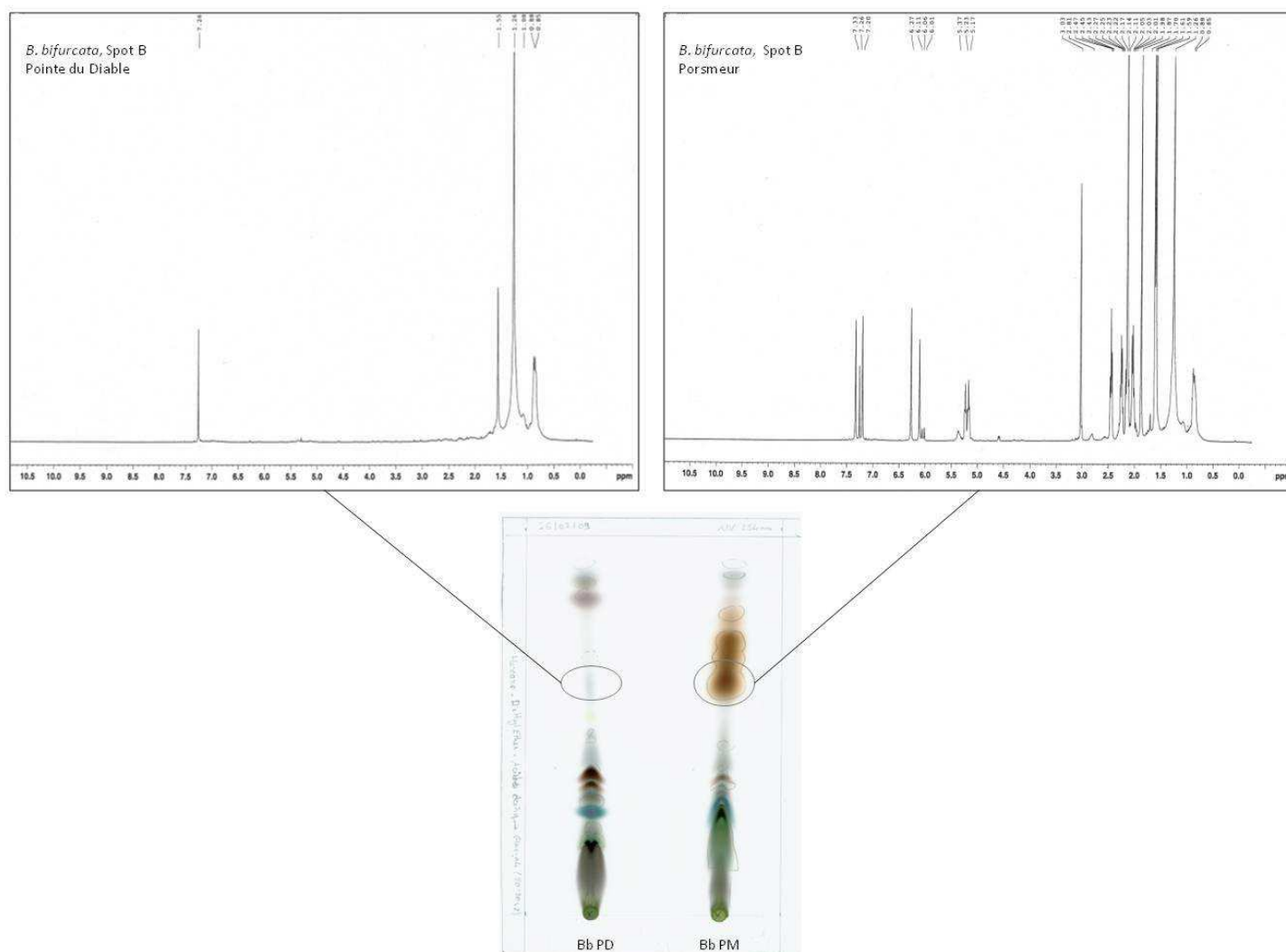


Figure 71 : Résultats de l'analyse ^1H RMN du spot discriminant retenu (spot dont le $R_f = 0,62$) chez *Bifurcaria bifurcata* récoltée à la pointe du diable (Bb PD) et à Porsmeur (Bb PM)

Le spot sélectionné ne montre pas les mêmes composés en fonction du site considéré (les signaux RMN sont différents).

Le spectre ^1H du spot B obtenu à partir de *Bifurcaria bifurcata* récoltée à la Pointe du Diable ne présente pas un profil où les signaux majoritaires sont compris entre 0,8 et 2 ppm. Au contraire, le spot de *B. bifurcata* récoltée à Porsmeur montre un profil plus complexe avec des signaux répartis entre 7,5 et 0,5 ppm (Figure 71)

2.3.1.2.1. Analyses par RMN et LC-MS du spot B de l'extrait de *Bifurcaria bifurcata* en provenance de Porsmeur (Spot B-BbPM)

Le spot B de l'extrait dichlorométhane:méthanol (2:1, v:v) de *Bifurcaria bifurcata* récoltée en décembre 2006 à Porsmeur (noté B-BbPM) a été analysé par RMN du proton et du carbone. L'analyse des spectres RMN ^1H (Figure 72), RMN ^{13}C (Figure 73) et 2D (COSY, HMQC et HMBC) ont permis de mettre en évidence un composé majoritaire.

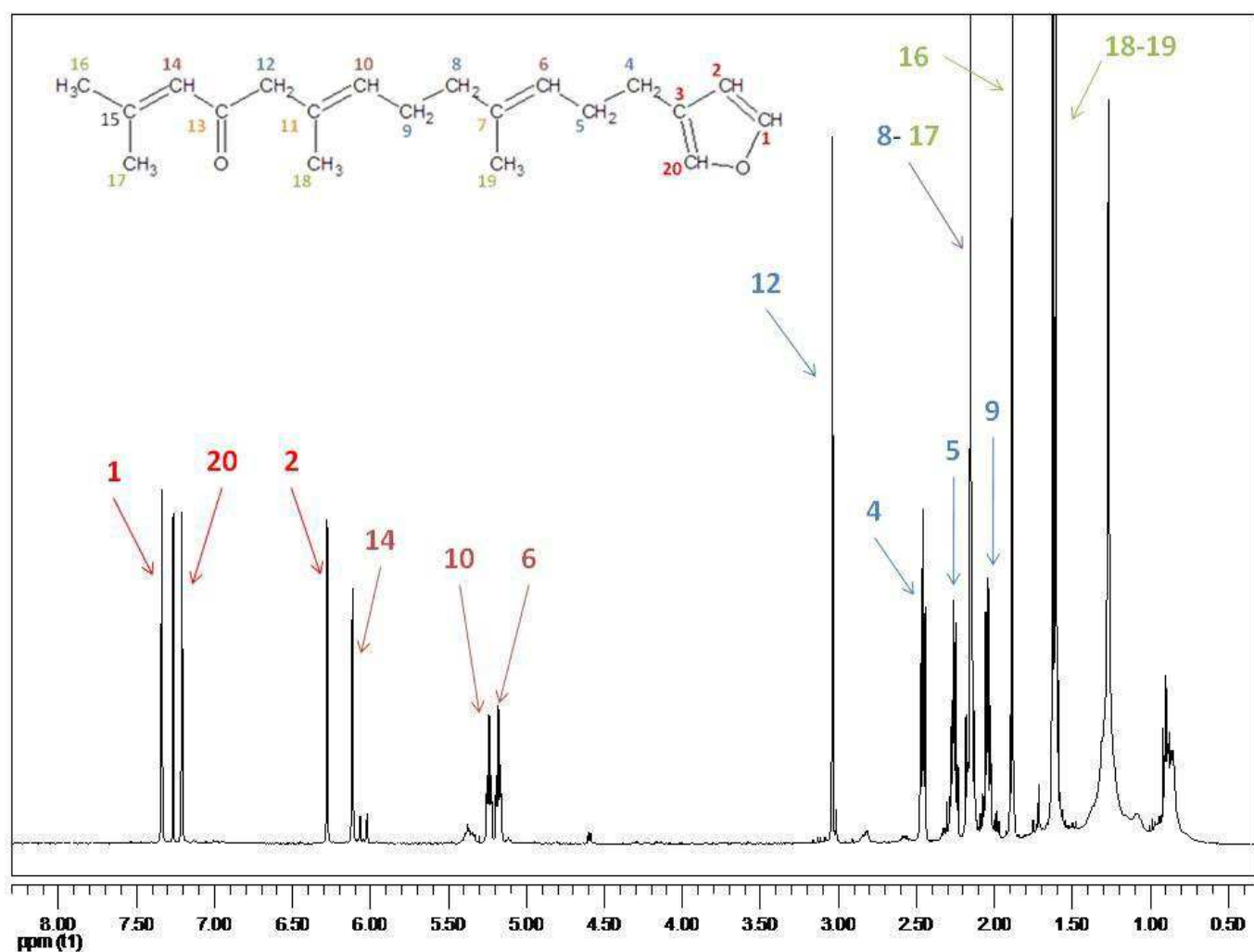


Figure 72 : Spectre ^1H RMN du spot B de l'extrait dichlorométhane:méthanol (2:1, v:v) de *Bifurcaria bifurcata* récoltée en décembre 2006 à Porsmeur. Les attributions des signaux caractéristiques du composé majoritaire (la bifurcanone) sont représentées en couleur, d'après Hougaard *et al.* (1991).

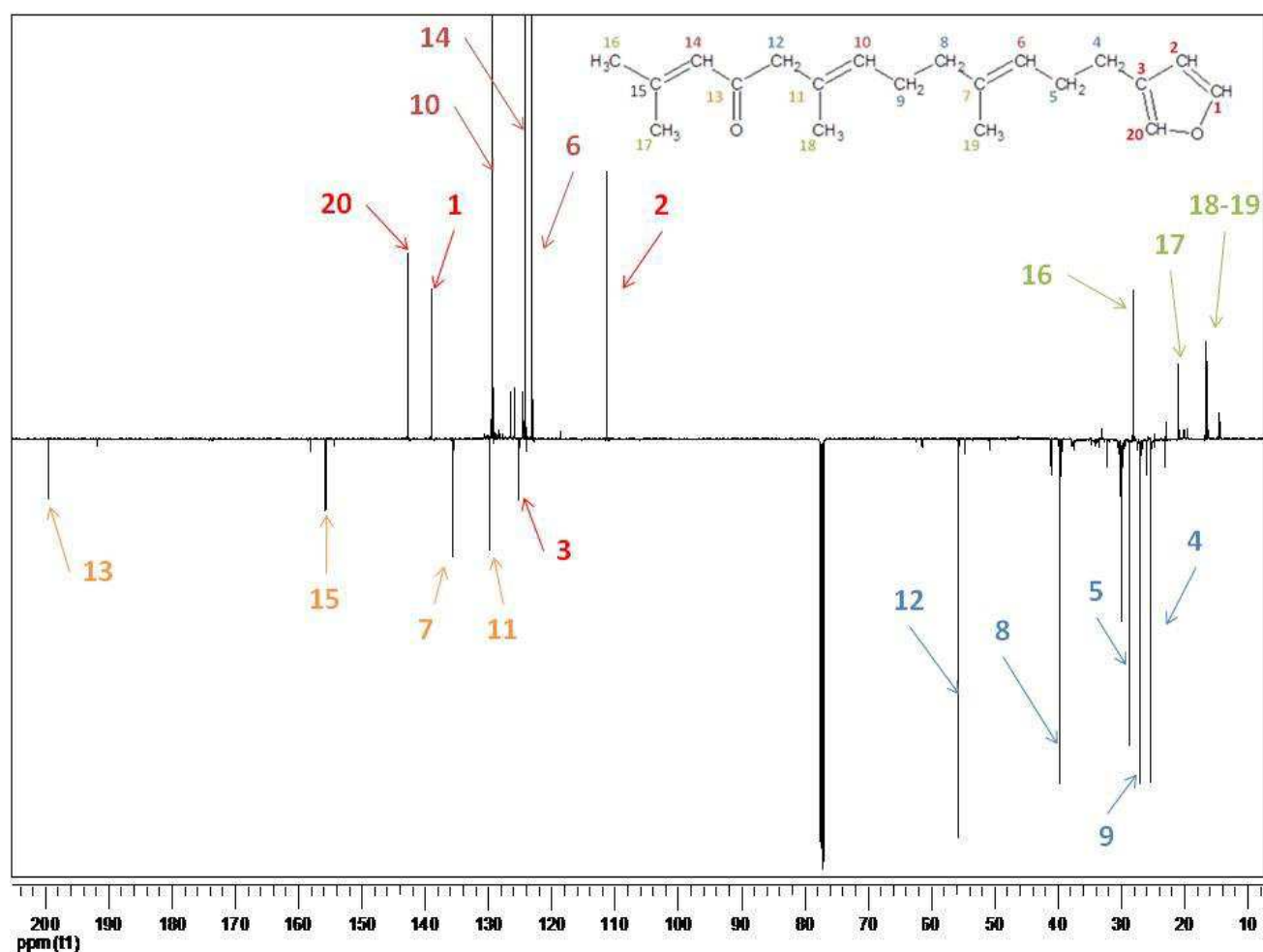


Figure 73 : Spectre ^{13}C RMN du spot B de l'extrait dichlorométhane:méthanol (2:1, v:v) de *Bifurcaria bifurcata* récoltée en décembre 2006 à Porsmeur. Les attributions des signaux caractéristiques du composé majoritaire (la bifurcanone) sont représentées en couleur, d'après Hougaard *et al.* (1991).

La confrontation des signaux obtenus avec la littérature (Tableau 14) a permis d'établir qu'il s'agissait d'un diterpène linéaire, présentant une fonction cétone et une partie furannique décrit par Hougaard *et al.* (1991). Ce composé, [3-((3E,7E)-10-oxo-4,8,12-triméthyltridéca-3,7,11-trienyl)furan], ne diffère de la bifurcanone que par sa fonction cétone en position C13. Ainsi, ce composé a été nommé bifurcanone dont la formule chimique est présentée aux Figures 72 et 73.

L'attribution des signaux caractéristiques de la bifurcanone sont présentés sur chacun des spectres RMN (Figure 72 et 73) et sont repris dans le Tableau 14. La présence de bifurcanone a été confirmée par l'analyse par LC-MS du spot B-BbPM (Figures 74 à 77).

Tableau 14 : Données des spectres RMN du proton (^1H -RMN) et du carbone (^{13}C -RMN) et attributions des signaux obtenus lors de cette étude et décrites également par Hougaard *et al.* (1991) pour comparaison

HCDCl_3 (500 MHz)	CD_3OD (250 MHz) Hougaard <i>et al.</i> (1991)	^{13}C	CDCl_3 (125 MHz)	CD_3OD (62,85 MHz) Hougaard <i>et al.</i> (1991)	Attribution
17,33 <i>s</i>	7,332 <i>t</i> (1,7)	1	142,0	138,12	CH
26,27 <i>s</i>	6,24 <i>d</i> (1,1)	2	111,08	110,09	CH
3-	-	3	124,98	124,22	C
42,45 <i>t</i>	2,40 <i>t</i> (7,4)	4	25,04	24,04	CH ₂
52,23 <i>q</i>	2,20 <i>q</i> (7,4)	5	28,45	27,64	CH ₂
65,17 <i>t</i>	5,14 <i>dt</i> (1,2, 7,1)	6	122,90	122,00	CH
7-	-	7	135,50	134,36	C
82,14 <i>t</i>	2,09 <i>t</i> (6,5)	8	39,31	38,46	CH ₂
92,01 <i>t</i>	2,01 <i>q</i> (6,5)	9	27,113	25,74	CH ₂
105,23 <i>t</i>	5,22 <i>dt</i> (1,2, 6,9)	10	129,11	123,52	CH
11-	-	11	129,65	128,66	C
123,03 <i>s</i>	2,99 <i>s</i>	12	55,445	54,17	CH ₂
13-	-	13	199,50	199,71	C
146,09 <i>s</i>	6,14 <i>t</i> (1,3)	14	124,07	128,46	CH
15-	-	15	55,58	155,63	C
161,87 <i>s</i>	1,85 <i>d</i> (1,2)	16	27,78	18,99	CH ₃
172,14 <i>s</i>	2,08 <i>d</i> (1,1)	17	20,00	25,86	CH ₃
181,60 <i>d</i>	1,65 <i>s</i>	18	16,00	14,64	CH ₃
191,60 <i>d</i>	1,65 <i>s</i>	19	16,00	14,28	CH ₃
207,20 <i>s</i>	7,19 <i>t</i> (1,7)	20	138,85	141,83	CH

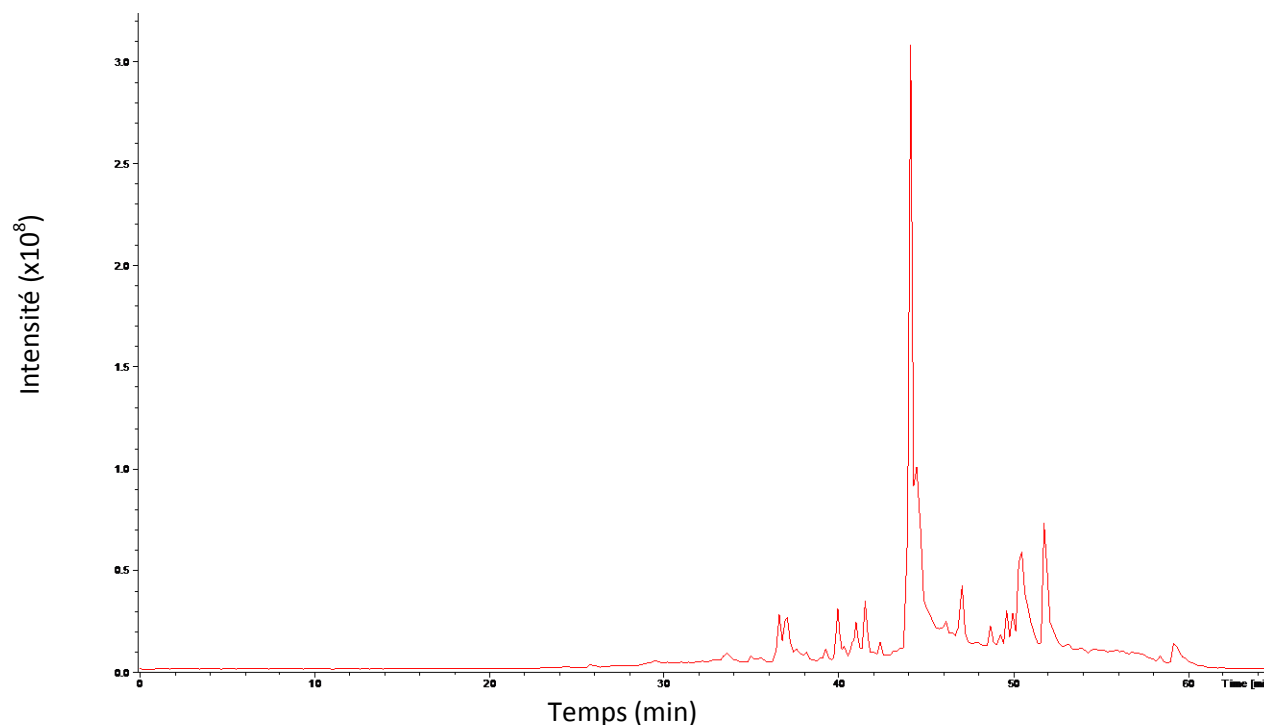


Figure 74 : Chromatogramme obtenu par analyse LC-MS du spot B-BbPM de l'extrait dichlorométhane:méthanol (2:1, v:v) de *Bifurcaria bifurcata* récoltée en décembre 2006 à Porsmeur

Les résultats obtenus par LC-MS (Figure 74) mettent en évidence :

- la présence d'un composé majoritaire, probablement la bifurcanone, représenté par un pic sortant à 45 min et qui présente un épaulement,
- ainsi que d'autres produits minoritaires.

La Figure 75 présente le chromatogramme de masse du composé majoritaire présent dans le spot B-BbPM. Ce composé majoritaire possède une masse molaire de 300 g/mole. De plus, ce chromatogramme présente au total 3 pics :

- à m/z 301, ce qui correspond à la masse du composé plus la masse d'un proton, c'est le pic $[M+H]^+$ de ce composé majoritaire.
- à m/z 323, ce qui correspond à la masse du composé plus la masse d'un atome de sodium, c'est le pic $[M+Na]^+$ de ce composé majoritaire.

- à m/z 283, ce qui correspond à la masse du composé moins la masse d'un atome d'eau plus celle d'un proton. C'est le pic $[M-H_2O+H]^+$ de ce composé majoritaire.

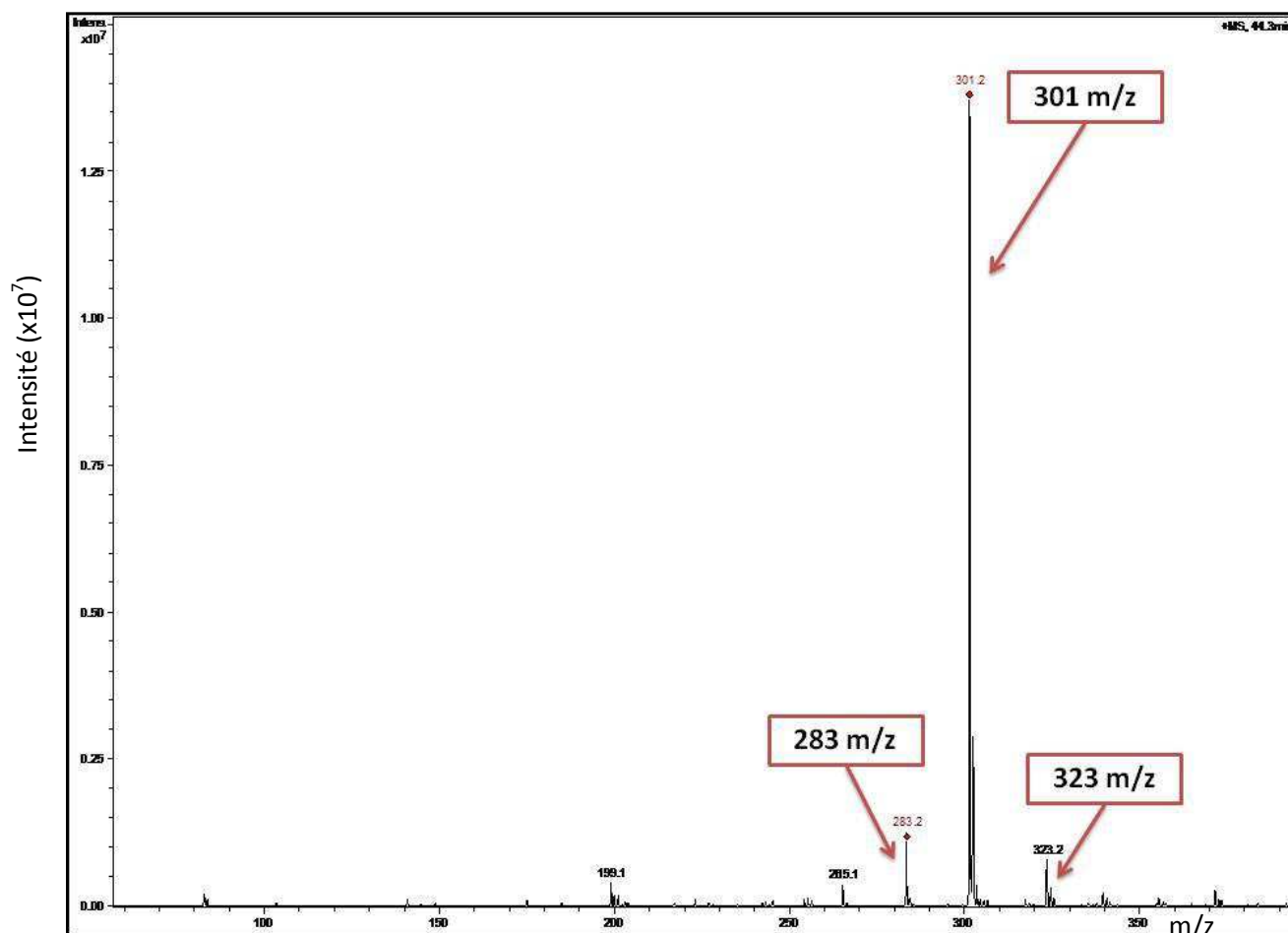


Figure 75 : Chromatogramme de masse du composé majoritaire du spot B-BbPM de l'extrait dichlorométhane:méthanol (2:1, v:v) de *Bifurcaria bifurcata* récoltée en décembre 2006 à Porsmeur

Le composé furannique décrit par Hougaard *et al.* (1991) a une masse molaire de 300 g/mol, le spectre de masse obtenu ici (Figure 75) est donc en accord avec cette structure.

Le chromatogramme UV à 195 nm (Figure 76) confirme les données obtenues en LC-MS. En effet, nous pouvons observer un pic majoritaire aux alentours de 44 min avec un petit épaulement correspondant à un produit minoritaire, probablement un diterpène isomère du produit majoritaire, ainsi que d'autres diterpènes plus polaires (entre 30 et 44 min.). Le pic à 13 min correspond au dichlorométhane et le pic large aux alentours de 60 min à des produits relargués par la colonne, qui ne sont pas dus à l'échantillon.

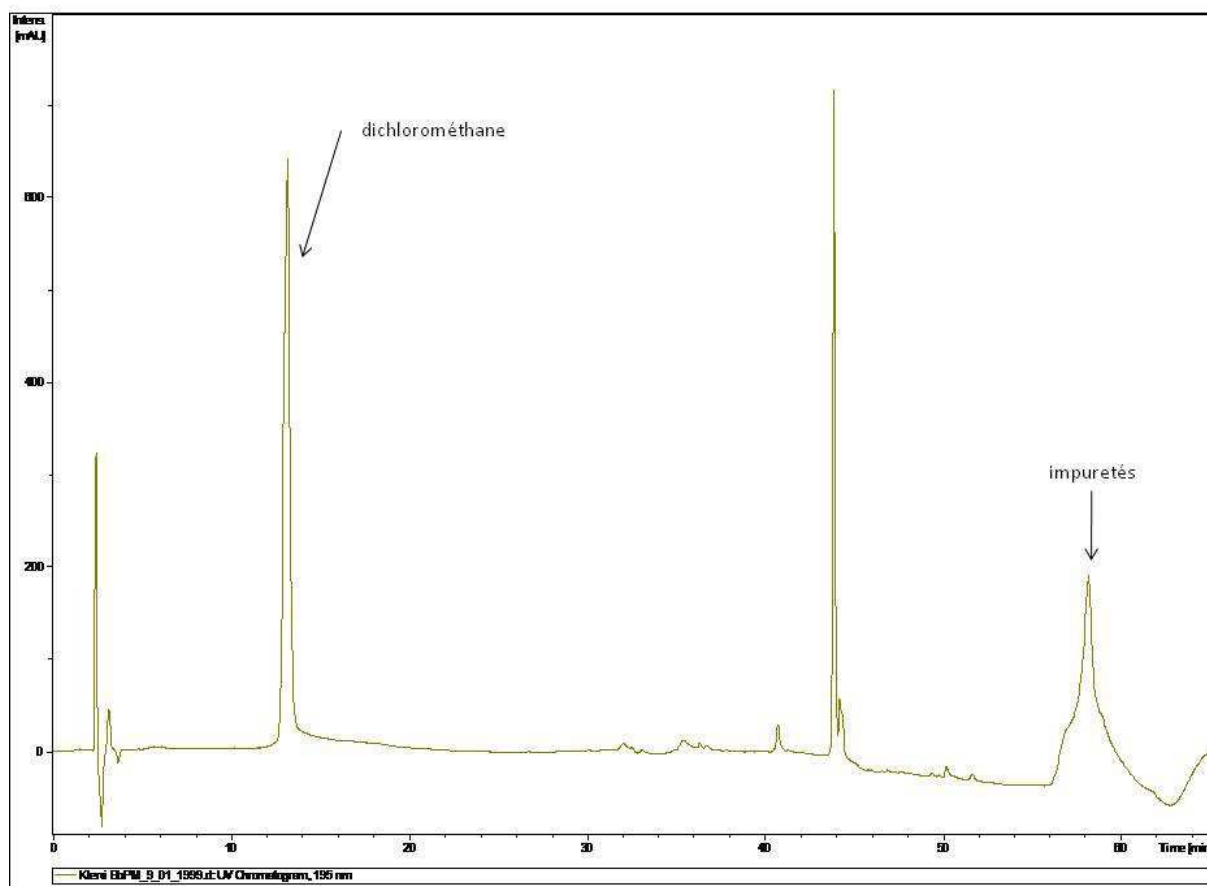


Figure 76 : Chromatogramme UV à 195 nm du spot B BbPM de l'extrait dichlorométhane:méthanol (2:1, v:v) de *Bifurcaria bifurcata* récoltée en décembre 2006 à Porsmeur.

Le chromatogramme UV à 254 nm (Figure 77) confirme les données obtenues par l'analyse LC-MS. En effet, comme sur le chromatogramme précédent (Figure 76), nous pouvons observer un pic majoritaire aux alentours de 44 min avec un petit épaulement correspondant à un produit minoritaire, probablement un diterpène isomère du produit majoritaire. Nous en déduisons donc que le pic majoritaire correspond forcément à un composé possédant une fonction cétone en C-13, fonction connue pour absorber à cette longueur d'onde de 254 nm.

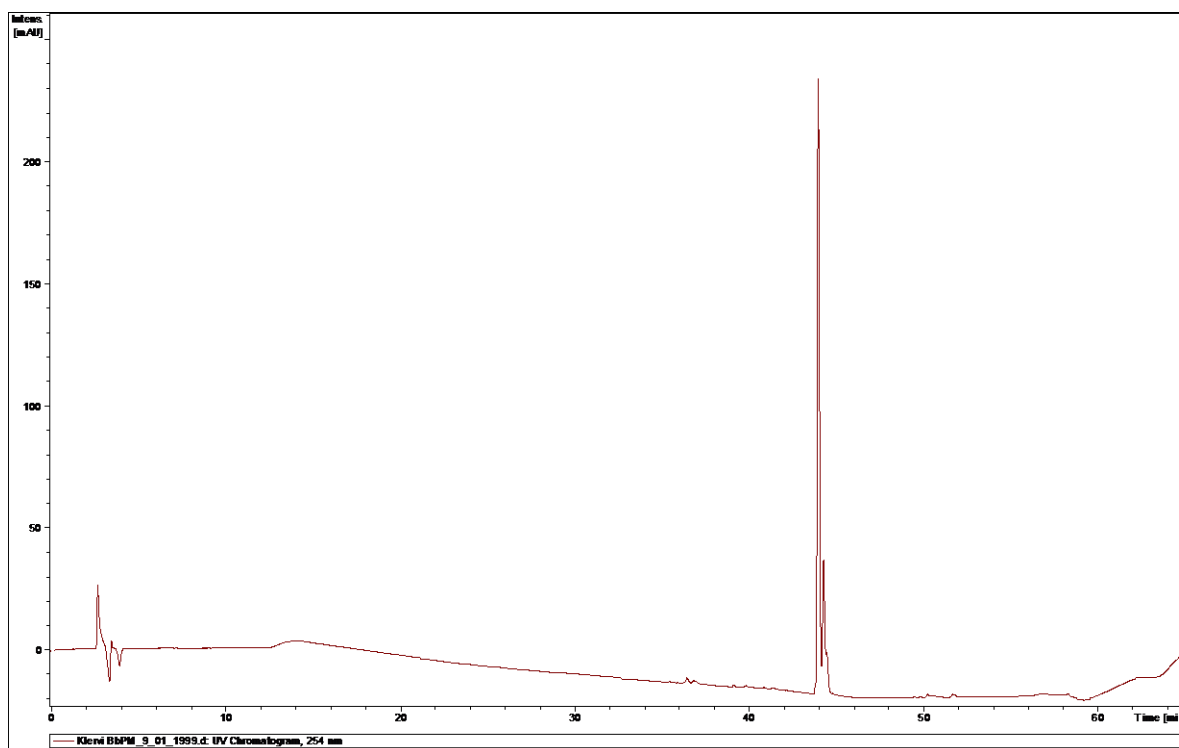


Figure 77 : Chromatogramme UV à 254 nm du spot B BbPM de l'extrait dichlorométhane:méthanol (2:1, v:v) de *Bifurcaria bifurcata* récoltée en décembre 2006 à Porsmeur

Ainsi, les analyses en LC-MS confirment les résultats obtenus par les analyses des spectres RMN. **Le composé majoritaire du spot B BbPM de l'extrait dichlorométhane:méthanol (2:1, v:v) de *Bifurcaria bifurcata* récoltée en décembre 2006 à Porsmeur est la bifurcanone.**

2.3.1.2.2. Analyses par RMN du spot B de l'extrait de *Bifurcaria bifurcata* en provenance de la Pointe du Diable (spot B-Bb-PD)

Le spot B de l'extrait dichlorométhane:méthanol (2:1, v:v) de *Bifurcaria bifurcata* récoltée en décembre 2006 à la Pointe du Diable a été analysé par RMN du proton. L'analyse du spectre ^1H RMN indique que ce spot, nommé B-Bb-PD, est constitué majoritairement de composés présentant des hydrocarbures linéaires caractérisés par des chaînes aliphatiques de méthylènes (1,3 ppm) avec des groupements méthyles (0,90 ppm) en bout de chaînes (Figure 78). Le signal à 1,55 ppm est probablement dû à la présence d'eau dans l'échantillon. Les composés terpéniques ne sont donc pas majoritaires dans ce spot et il diffère dans sa composition du spot B-Bb-PM.

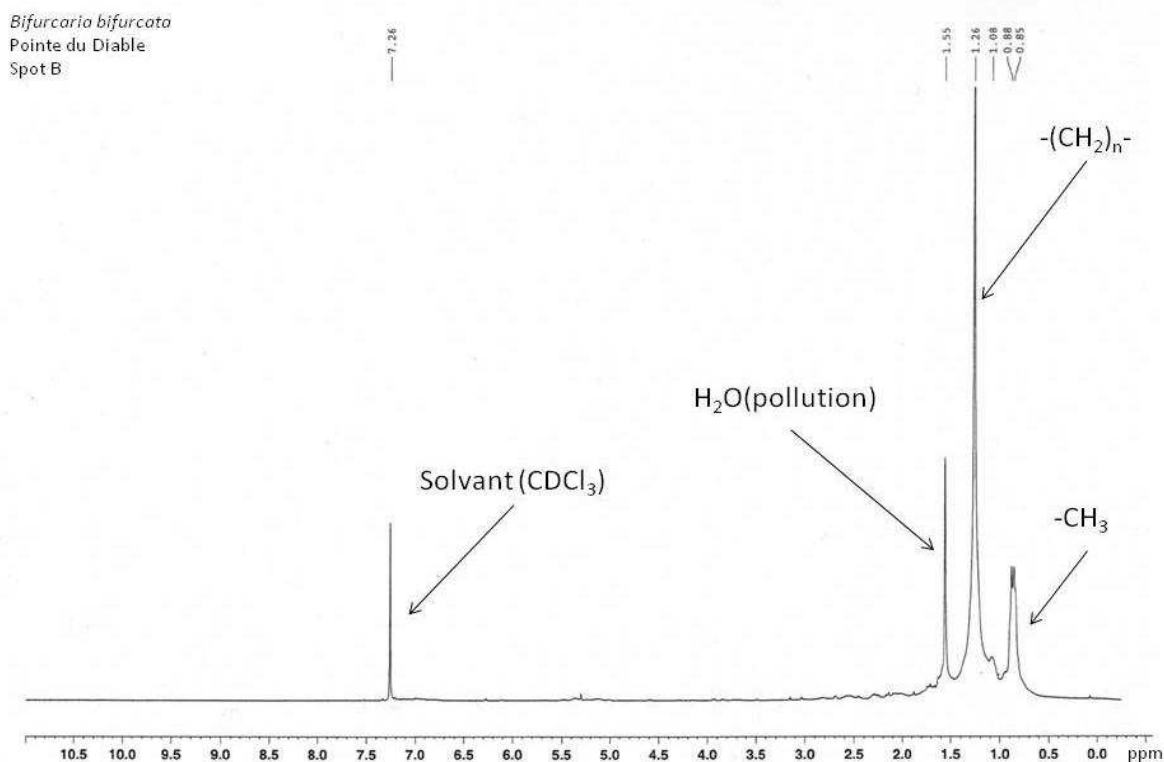


Figure 78 : Spectre ^1H RMN du spot B de l'extrait dichlorométhane:méthanol (2:1, v:v) de *Bifurcaria bifurcata* récoltée en décembre 2006 à la Pointe du Diable.

Ainsi, les diverses analyses effectuées sur les extraits et les spots B de *Bifurcaria bifurcata* récoltée à la Pointe du Diable et à Porsmeur révèlent la présence de **deux types chimiques** : le type chimique rencontré à **Porsmeur (spot B-BbPM)** et caractérisé par la présence de la **bifurcanone** et le type chimique rencontré à **la Pointe du Diable (spot B-BbPD)** qui ne présente pas de **bifurcanone**.

2.3.2. Recherche de la limite géographique de la répartition des types chimiques

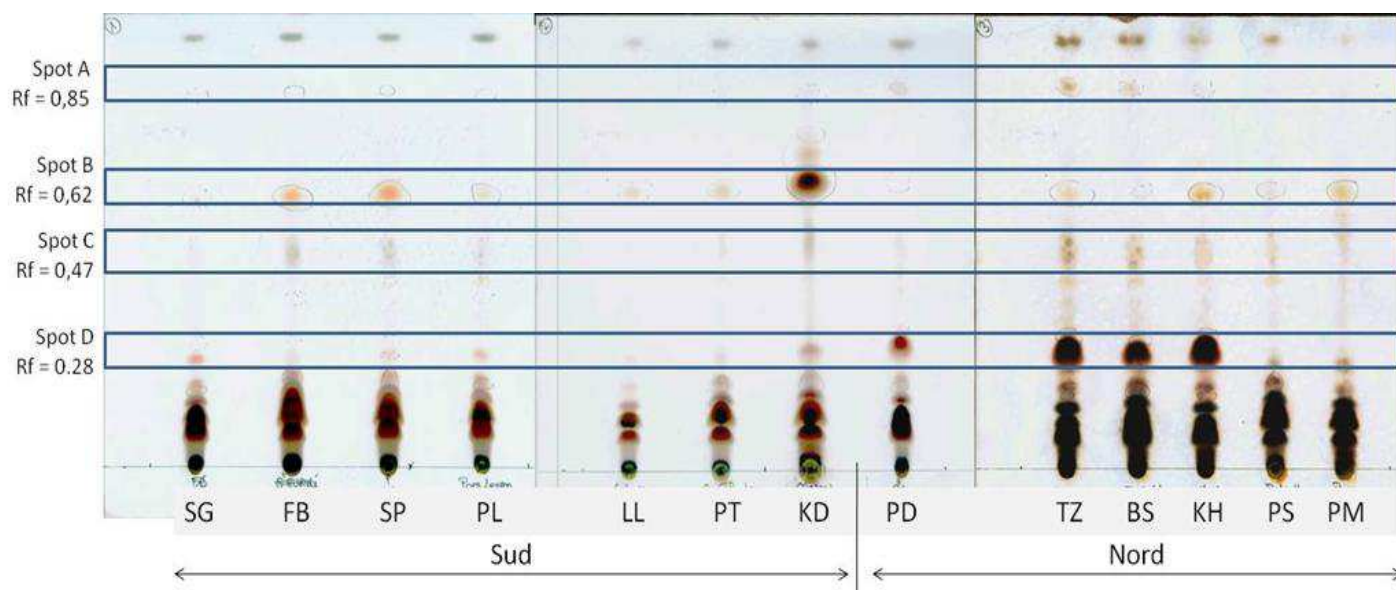
Les analyses par chromatographie couche mince sur les extraits terpéniques obtenus à partir d'échantillons de *Bifurcaria bifurcata* récoltés tout autour de la pointe bretonne, de Fort Bloqué à Portsall, sont présentées à la Figure 79. Ces résultats montrent que les échantillons présentent un profil CCM différent en fonction des sites de prélèvement.

Ainsi, les échantillons récoltés au Trez-Hir, aux Blanc Sablons et à Kerhornou présentent le même profil CCM avec des spots A et D très marqués (Figure 79). L'échantillon en provenance de la Pointe du Diable montre également un profil similaire aux échantillons précédents, même si les spots sont moins

intenses. De même, les échantillons en provenance de Fort Bloqué et de Saint Pierre montrent des profils proches avec des spots B et C plus intenses que le spot D et un spot A non décelable. Les échantillons récoltés à Saint Guénolé, Pors lesven, Pors Théolen, Porsmeur et Portsall sont caractérisés par la présence des spots B, C et D et l'absence du spot A.

Quant aux échantillons récoltés au Loc'h et au Kador, ils montrent des profils atypiques vis-à-vis des échantillons précédents avec (Figure 79) :

- la présence de deux spots uniquement pour les échantillons du Loc'h , les spots B et D avec le spot B qui est plus intense que le spot D, à peine décelable
- et la présence des 4 spots A, B, C et D pour l'échantillon prélevé au Kador.



Légende:

SG = Saint Guénolé	PD = Pointe du Daible
FB = Fort Bloqué	TZ = Trez-Hir
SP = Saint Pierre	BS = Blanc Sablons
PL = Pors Lesven	KH = Kerhornou
LL = Le Loc'h	PS = Portsall
PT = Pors Théolen	PM = Porsmeur
KD = Kador	

Figure 79 : Analyse par CCM des extraits terpéniques obtenus à partir d'échantillons de *Bifurcaria bifurcata* récoltés le long des côtes de la Pointe Bretagne (cf. Figure 67 pour la localisation des différents sites visités).

La Figure 80 présente les résultats obtenus par l'Analyse en Composante Principale (ou ACP) effectuée sur les profils CCM des extraits terpéniques des échantillons de *Bifurcaria bifurcata* récoltés de Fort Bloqué à Portsall. En classant par ordre d'intensité les spots A, B, C et D des profils présentés à la Figure 79, nous avons pu regrouper les échantillons et mettre en évidence un regroupement des profils CCM en fonction des caractéristiques des sites de prélèvement. Nous avons ainsi pu regrouper :

- Porsmeur et Portsall,
- Fort Bloqué et Saint Pierre,
- Pors Théolen, Saint Guénolé et Pors Lesven
- et enfin, le Trez-Hir, Kerhornou, les Blanc Sablons et la Pointe du Diable.

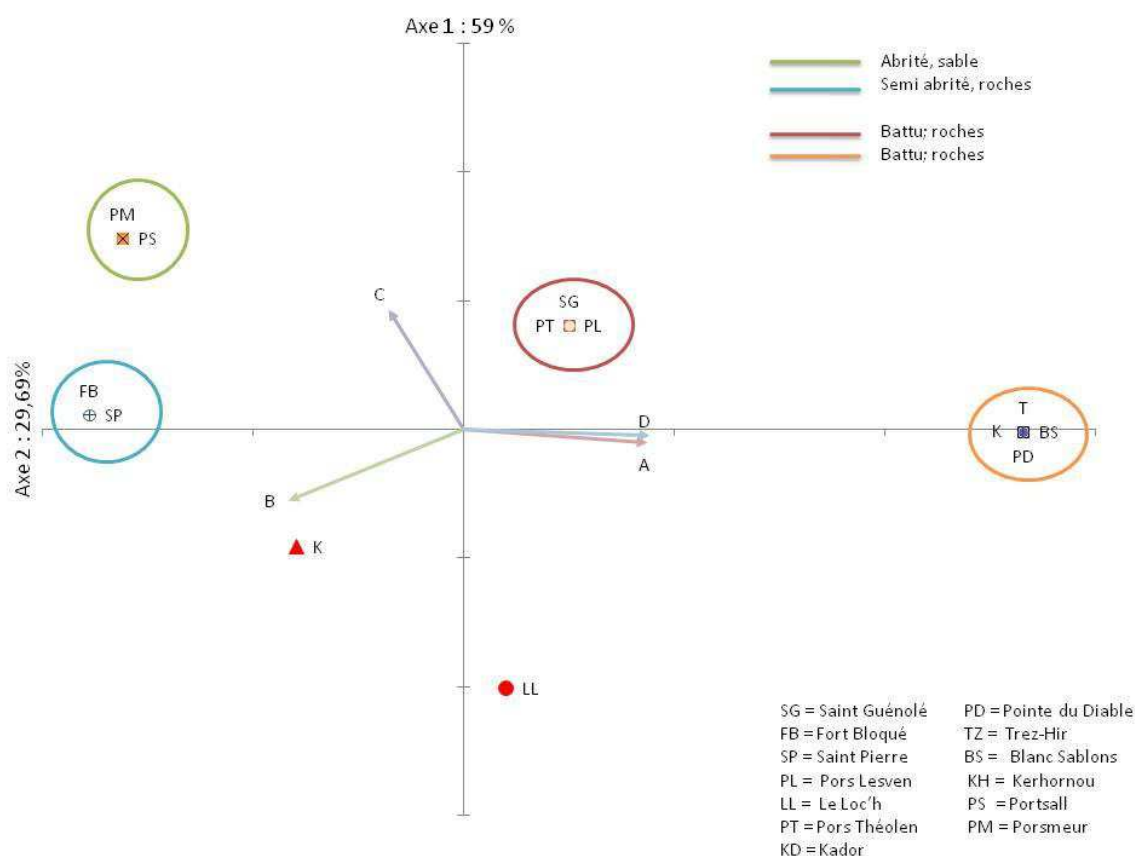


Figure 80 : Analyse en composante principale effectuée sur les profils CCM des extraits terpéniques des échantillons de *Bifurcaria bifurcata* récoltés autour de la pointe bretonne, de Fort Bloqué à Portsall (cf. Figure 67 pour la localisation des différents sites).

Les échantillons prélevés au Kador et au Loc'h se démarquent des autres et ne sont rattachés à aucun groupe. Ainsi, nous avons mis en évidence 6 profils chimiques, c'est-à-dire 6 écotypes qui sont fonction de l'environnement de l'algue. Ces écotypes sont présentés dans le Tableau 15. Ainsi, les extraits de *Bifurcaria bifurcata*, en provenance de la Pointe du Diable, du Trez-Hir, des Blanc Sablons et de Kerhornou, forment un groupe homogène, nommé « Ecotype 1 », où les conditions du milieu sont caractérisées par un fort hydrodynamisme et un substrat rocheux.

Tableau 15 : Présentations des 6 écotypes chimiques retrouvés chez *Bifurcaria bifurcata* et distribués le long des côtes bretonnes, du Finistère au Morbihan.

Site	Substrat	Hydrodynamisme	Ecotype
Kerhornou, Blanc Sablons, Trez-Hir et la Pointe du Diable	Roches	battu	1
Pors Théolen, saint-Guérolé et Pors-Lesven	Roches	Battu	2
Fort Bloqué et Saint-Pierre	Roches	Semi- abrité	3
Portsall et Porsmeur	Sable	Abrité	4
Kador	Sable majoritaire	Semi- abrité	5
Le Loc 'h	Sable majoritaire	abrité	6

Les extraits de *B. bifurcata* récoltée à Pors Théolen, Saint Guérolé et Pors Lesven présentent des profils similaires et forment également un ensemble homogène. Ces trois sites présentent, comme les quatre sites précédents, un mode d'hydrodynamisme de type battu et un faciès rocheux, mais ils se différencient statistiquement, probablement à cause de la masse d'eau. Nous avons regroupé ces 3 types d'extrait sous le terme d'« Ecotype 2 ».

Les extraits de *B. bifurcata*, récoltés à Saint Pierre et à Fort Bloqué, proviennent de deux sites dits semi-abrités et présentant un substrat rocheux avec des écoulements et des mares. Ils ont été regroupés par l'analyse ACP et forment un groupe appelé « Ecotype 3 ».

Enfin, les extraits de *B. bifurcata*, en provenance de Porsmeur et Portsall, se distinguent également des autres groupes formés par l'ACP. Ces deux sites sont caractérisés par un mode d'hydrodynamisme de type abrité et présentent un substrat sableux. Ils ont été groupés sous la nomination d'« Ecotype 4 ».

L'extrait de *B. bifurcata* récoltée au Kador, site caractérisé par un mode semi-abrité et un substrat à dominance sableuse (les populations de *B. bifurcata* vivent à la limite sable et roches) se démarque des autres groupes et forme seul l'« Ecotype 5 ».

De même, l'échantillon en provenance du Loc'h, site abrité et caractérisé par un substrat mixte, sable et roches mais à dominance sableuse, forme l'« Ecotype 6 ».

3. Discussion

3.1. Distinction interspécifique par l'isolement de chimiomarqueurs au sein du genre *Turbinaria*

Cette étude a permis d'identifier pour la première fois un chimiomarqueur spécifique de *Turbinaria conoides* : l'acide turbinarique.

La présence de composés spécifiques à certaines espèces et donc, marqueurs chimiotaxonomiques de ces espèces est connue chez les macroalgues.

Par exemple, *Laurencia* Lamouroux (Rhodophyceae), est un genre unique, à cause de la capacité des espèces à synthétiser une large variété de métabolites halogénés dont les diverses structures sont fonction des espèces considérées (Vairappan *et al.* 2001). Ainsi, *Laurencia majuscula* (Harvey) A.H.S. Lucas produit un sesquiterpène bromé spécifique, le (6R,9R,10S)-10-bromo-9-hydroxy-chamigra-2,7(14)-diène, identifié pour la première fois chez cette espèce (Vairappan *et al.* 2001). *Laurencia nidifica* J. Agardh synthétise du laurenterol et de l'isolaurenterol alors que *Laurencia cartilaginea* Yamada et *Laurencia concreta* A.B. Cribb ne produisent aucun métabolite secondaire halogéné (Vairappan *et al.* 2001). Ces composés halogénés spécifiques sont utilisés à des fins taxonomiques (Retz de Carvalho et Franca Roque 2004, Suzuki *et al.* 2005).

Chez les algues brunes, les études ont surtout porté sur le genre *Cystoseira*. Les métabolites secondaires de *Cystoseira* présentent un fort potentiel chimiotaxonomique : il s'agit de diterpènes associés ou non avec une partie aromatique et ne portant pas d'halogène (Kornprobst 2005). Ainsi, selon la synthèse effectuée par Valls et Piovetti (1995), les espèces du genre *Cystoseira* se répartissent en 3 groupes chimiques en fonction de la structure de leurs terpènes (Tableau 16). Ces auteurs rapportent également l'existence de composés terpéniques spécifiques à certaines espèces de ce genre, comme par exemple la cystolgerone chez

Cystoseira algeriensis, l'amentol présent chez *C. stricta* et le cystoseirol D chez *C. mediterranea* (Valls et Pioveti 1995).

Tableau 16 : Groupes chimiques des espèces du genre *Cystoseira* ayant un caractère chimiotaxonomique.

Groupe taxonomique	Caractéristiques chimiques	Exemple d'espèces
Groupe I	Pas de diterpènes	<i>C. humilis</i> , <i>C. sedoides</i>
Groupe II	Présence de diterpènes linéaires	<i>C. balearica</i> , <i>C. brachycarpa</i>
Groupe III	Présence de méroditerpènes	
- sous-groupe IIIa	- méroditerpènes linéaires	<i>C. adriatica</i> , <i>C. elegans</i> ,
- sous-groupe IIIb	- méroditerpènes cycliques	<i>C. algeriensis</i> , <i>C. baccata</i> ,
- sous-groupe IIIc	- méroditerpènes transposés	<i>C. mediterranea</i> , <i>C. stricta</i> ,

Concernant le genre *Turbinaria*, c'est la première fois qu'un chimiomarqueur est rapporté au sein de ce genre. De plus, ce composé est décrit pour la première fois chez *T. conoides*. Cependant, Asari *et al.* (1989) avait déjà décrit l'acide turbinarique chez un spécimen de *T. ornata*, récoltée au Japon. Néanmoins, nous avons montré dans notre étude que, malgré une large variation géographique (îles Salomon, Nouvelle Calédonie, îles Fidji et Tahiti), l'acide turbinarique ne se retrouvait dans aucun des échantillons de *T. ornata* étudiés. Comme les deux espèces sœurs sont présentes dans la zone d'étude d'Asari *et al.* (1989) au Japon, il est possible que ces auteurs n'aient pas correctement identifié l'espèce, et qu'ils aient travaillé sur *Turbinaria conoides* et non sur *Turbinaria ornata*. Un examen de l'échantillon référence à cette étude serait nécessaire afin de confirmer la possible erreur taxonomique survenue lors de l'identification de l'espèce japonaise.

Cette probable erreur d'identification montre bien d'une part **la difficulté d'identifier certaines espèces** et d'autre part de **l'importance de les identifier correctement**. C'est pourquoi cette étude propose trois techniques simples, rapides et efficaces pour détecter l'acide turbinarique et donc de discriminer les deux espèces sœurs de *Turbinaria*.

La première technique est la ^1H RMN HR-MAS. Cette méthode, utilisée par Le Lann *et al.* (2008) a depuis été validée par une série de manipulations sur des échantillons en provenance de Nouvelle Calédonie, des îles Fidji et de Tahiti. Néanmoins, si cette méthode innovante est la plus rapide, car ne demandant pas d'extraction préalable, elle nécessite un service RMN doté d'une sonde HR-MAS et un groupe taxonomique qui se prête à de telles analyses. En effet, des essais ont été menés sur le genre

Sargassum et l'étude chimiotaxonomique par la méthode RMN HR-MAS n'a pas donné satisfaction. Les espèces du genre *Sargassum* testées ne présentent pas de différences dans les métabolites aussi marquées que *Turbinaria ornata* et *Turbinaria conoides*, il s'est donc avéré difficile d'identifier des signaux caractéristiques de ces espèces. De plus, l'identification d'un composé par espèce semble peu réalisable au vue de la très grande diversité de ce genre. Néanmoins, des essais ont donné des résultats prometteurs en ce qui concerne le genre *Cystoseira* en Atlantique (Jegou, thèse en cours). C'est un genre dont la morphologie des individus est similaire aux espèces du genre *Sargassum* et qui est peu diversifié en Atlantique.

La deuxième technique est la ^1H RMN des solutions. Cette méthode est rapide (quelques minutes pour un échantillon) mais demande au préalable une extraction des composés apolaires et nécessite un service RMN. Cette méthode reste une méthode de validation, par le passage en ^1H RMN des extraits apolaires des échantillons (d'espèces du genre *Turbinaria* en provenance des îles Salomon, de la Nouvelle Calédonie, des îles Fidji et de Tahiti dans notre étude).

La troisième technique est la CCM. Cette méthode est relativement longue (quelques heures) mais il s'agit de la plus facile à mettre en œuvre car elle ne demande pas de technologies particulières à l'inverse des deux premières méthodes. Elle a permis la distinction très rapide des deux espèces par leurs profils CCM différents et d'isoler un composé spécifique à *Turbinaria conoides* par l'identification d'un spot qui n'apparaît que sur le profil CCM de cette espèce (ce spot est absent du profil CCM de *Turbinaria ornata*).

Il serait maintenant intéressant d'élargir l'étude menée en ^1H RMN HR-MAS à tout le Pacifique et de doser l'acide turbinarique au sein de divers échantillons de *Turbinaria conoides* afin d'étudier les possibles variations spatio-temporelles de ce composé atypique et comprendre pourquoi *T. ornata* qui vit dans un environnement similaire aux îles Salomon ne produit pas une telle molécule. Il faudrait pour ce faire mettre en place un dosage de l'acide turbinarique de type HPLC ou LC-MS.

3.2. Etude chimiotaxonomique de *Bifurcaria bifurcata*

Les diverses analyses effectuées sur les extraits et les spots B de *Bifurcaria bifurcata* récoltées à la Pointe du Diable et à Porsmeur révèlent la présence de deux types chimiques : le type chimique rencontré à Porsmeur (spot B-BbPM) caractérisé par la présence de la **bifurcanone** et le type chimique rencontré à la Pointe du Diable (spot B-BbPD) qui ne présente pas de bifurcanone.

De plus, les échantillons récoltés le long de côtes bretonnes de Portsall à Fort Bloqué présentent un profil CCM différent en fonction des sites de prélèvement. Nous avons mis en évidence 6 profils chimiques, c'est-à-dire 6 écotypes qui sont fonction de l'environnement de l'algue.

Les travaux précédents (Valls *et al.* 1995, Culioli *et al.* 1999a, Culioli *et al.* 1999b, Culioli *et al.* 2000, Daoudi *et al.* 2001, Culioli *et al.* 2002) n'indiquent pas les conditions environnementales des sites de prélèvement contrairement à notre étude qui montrent l'existence d'une corrélation entre le profil chimique des extraits algaux de *Bifurcaria bifurcata* et les facteurs de l'environnement. Ainsi, en milieu battu, nous avons montré que *B. bifurcata* synthétise majoritairement le(s) composé(s) du spot D, probablement de l'éléganolone ou de l'éléganediol (Figure 81), si l'on se réfère aux travaux antérieurs concernant les types chimiques chez *B. bifurcata* (Valls *et al.* 1995, Daoudi *et al.* 2001, Culioli *et al.* 2002).

La présence de l'un des deux composés est associée au type chimique 1 que nous avons nommé écotype 1 dans notre étude. En mode d'hydrodynamisme de types semi-abrité à abrité, *B. bifurcata* synthétise majoritairement de la bifurcanone. D'après la littérature, le type chimique 2 de *B. bifurcata* est caractérisé par la présence de la bifurcane. La différence entre la bifurcane et la bifurcanone provient de la fonction en position C13 de ces molécules. Pour la bifurcane, le carbone en position 13 est lié à une fonction hydroxyle, alors que dans le cas de la bifurcanone, c'est une fonction cétone. Ainsi une oxydation de la fonction hydroxyle de la bifurcane conduit à la formation de la bifurcanone. Cette oxydation peut s'expliquer par les conditions d'extraction et de purification de ces composés qui diffèrent suivant les auteurs :

- Valls *et al.* (1995) utilisent du diéthyle éther comme solvant d'extraction. Puis ces auteurs purifient l'extrait via une séparation de phase à l'eau avant de fractionner la partie organique par chromatographie sur gel de silice avec un gradient allant de l'hexane à l'acétate d'éthyle. Ils obtiennent ainsi la bifurcane qui est éluée avec de l'hexane:acétate d'éthyle (1:1 , v:v).
- Hougaard *et al.* (1991) ont obtenu leur extrait brut avec de l'acétate d'éthyle, puis ils ont fractionné une première fois cet extrait sur gel de silice en éluant avec de l'acétate d'éthyle : n-heptane (4:1 , v:v). Une deuxième purification sur colonne RP-8 avec de l'acétonitrile:eau (9:1 , v:v) leur ont permis d'isoler la bifurcanone.

Dans notre étude, l'extrait brut a été obtenu à partir du mélange de solvants dichlorométhane:méthanol (2:1 , v:v) et la bifurcanone a été isolée par séparation sur CCM avec de l'hexane:diéthyle éther:acide acétique glacial (80:20:2 , v:v:v). Ainsi, les différences dans le traitement des échantillons peuvent expliquer les différences observées au niveau de la fonction chimique présente en C13.

Concernant la composition du pool de composés terpéniques de *Bifurcaria bifurcata*, Culioli *et al.* (2002), ont montré que cette composition variait en fonction de la saison. En effet, comme illustré à la Figure 82, entre septembre et novembre, *B. bifurcata*, échantillonnée à Roscoff, favorise la synthèse de l'éléganolone et de la bifurcane (diterpènes minoritaires), au détriment de celle de l'éléganediol (diterpène majoritaire, Figure 81)

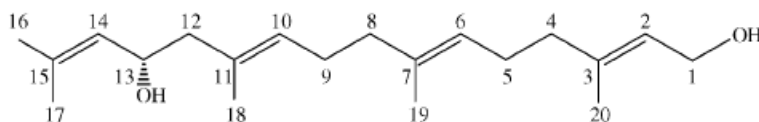


Figure 81 : Structure chimique de l'éléganediol (d'après Culioli *et al.* 2002).

Ainsi, *Bifurcaria bifurcata* récoltée à Roscoff peut être considérée de type 1 (absence de Bifurcane) si elle est échantillonnée en mars (Figure 82), mais être considérée de type 2 si elle est échantillonnée en juillet (Figure 82) (Culioli *et al.* 2002). Il est intéressant de remarquer que la période où les teneurs en diterpènes minoritaires sont les plus fortes correspond au début de la période de reproduction de l'espèce. Cette observation impose **une réflexion sur le rôle biologique des terpènes chez *Bifurcaria bifurcata*** et met en avant **l'importance de coupler des études biologiques, écologiques et chimiques afin de caractériser des types chimiques au sein d'une espèce.**

D'après les résultats de Culioli *et al.* (2002), la notion de types chimiques chez *Bifurcaria bifurcata* ne doit pas uniquement être basée sur la répartition géographique des populations. Cela est confirmé par notre étude qui a mis en évidence l'existence d'écotypes au sein de l'espèce *Bifurcaria bifurcata*.

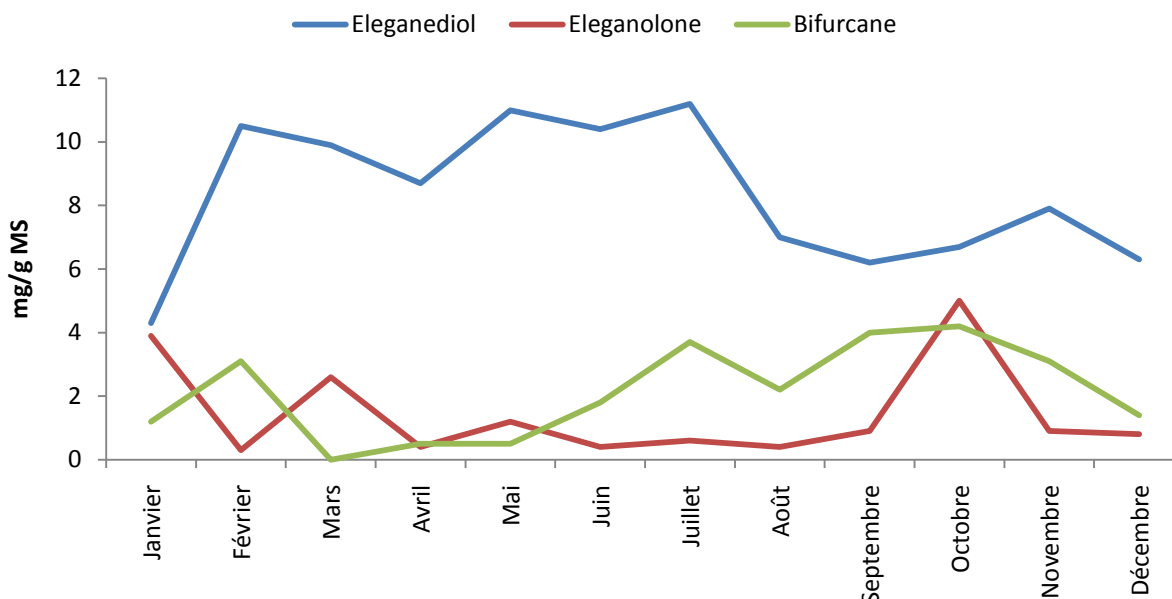


Figure 82 : Variations saisonnières de l'éléganediol, de l'éléganolone et de la bifurcane en mg/g de matière sèche (MS) chez *Bifurcaria bifurcata* récoltée à Roscoff entre juillet 1998 et juin 1999, modifié d'après Culioli *et al.* (2002).

La composition du pool de composés terpéniques varie en fonction des conditions de l'environnement telles que l'hydrodynamisme, la nature du substrat, mais également en fonction d'autres facteurs abiotiques tels que la température, la salinité, la concentration en nutriment et des facteurs biotiques tels que la pression des herbivores et des épiphytes et la concurrence pour le substrat (compétitions inter- et intraspécifique). Cela expliquerait les différences de profils chimiques observées entre les sites battus du Nord du Finistère et les sites battus, du Sud du Finistère.

C'est pourquoi, nous proposons la notion d'écotype. En effet, dans notre étude, la bifurcanone a été identifiée comme composé caractérisant les écotypes chez *Bifurcaria bifurcata*. Cependant, ce travail n'est que préliminaire, ayant été effectué sur une seule saison. En effet, il est nécessaire de mener une étude écologique sur les variations spatio-temporelles de la composition du pool de composés terpéniques afin de réellement caractériser ces différents écotypes. Des résultats prélimaires sur des échantillons de *Bifurcaria bifurcata* prélevés à Penmarc'h en février et juin 2009 ne montrent aucune différence dans leur profil chimique. Ceci reste à vérifier pour les autres provenances des échantillons.

Conclusion- Synthèse

Dans la première partie de ce Chapitre, nous avons montré l'existence d'un métabolite spécifique à *Turbinaria conoides* : l'acide turbinarique. Ce composé n'est en effet pas retrouvé chez l'espèce sœur *T. ornata*. **L'acide turbinarique a donc été considéré dans notre étude comme un chimiomarqueur de l'espèce *T. conoides* présente dans le Pacifique Sud.**

Dans la seconde partie de ce Chapitre, qui a concerné la chimiodiversité au sein de *Bifurcaria bifurcata*, nous avons confirmé **l'existence de 2 variétés chimiques : types 1 et 2** qui n'ont pas une distribution géographique si nette vis-à-vis des travaux de Valls *et al.* (1995). Nous avons, en effet, attribué ces variétés chimiques à **des écotypes particuliers** de cette espèce. Ainsi, en **milieu abrité**, l'espèce produit de la **bifurcanone** alors qu'en **milieu battu**, c'est la synthèse **d'un autre composé**, probablement l'éléganolone, qui est privilégiée. Nous avons ainsi montré chez *B. bifurcata* que certains métabolites appartenant à la classe des terpènes sont synthétisés de façon spécifique en fonction des conditions environnantes (biotiques et abiotiques). Dans le cadre de notre étude, nous avons identifié **la bifurcanone qui semble être synthétisée de façon préférentielle en milieu abrité et semi-abrité.**

Dans une optique de valorisation de la biomasse des Sargassaceae, il serait maintenant intéressant de tester le potentiel en terme d'activités biologiques de ces métabolites, ainsi que celui des composés étudiés au cours du Chapitre II (à savoir les composés phénoliques et la fucoxanthine). Cette recherche d'activités biologiques sur les extraits et/ou molécules isolées aux Chapitres II et III fait l'objet du Chapitre IV suivant, intitulé « Recherche de composés bioactifs au sein de la famille des Sargassaceae ».

CHAPITRE IV : RECHERCHE DE COMPOSES BIOACTIFS AU SEIN DE LA FAMILLE SARGASSACEAE

Introduction

Le milieu marin couvre environ 70% de la surface du globe et représente une énorme source de composés bioactifs (Ioannou et Roussis 2009). En effet, le milieu marin est un milieu extraordinairement riche et diversifié. De nombreux organismes, végétaux comme animaux, n'ont pas d'équivalent terrestre et certains sont exclusivement marins. En effet, 8 phylums animaux dont les Eponges, les Cnidaires, les Bryozoaires ou encore les Ascidies sont exclusivement marins. De plus, même si il existe des algues en milieu dulçaquicole, la plupart des espèces algales sont retrouvées en milieu marin.). Ainsi, ces organismes originaux sont source de métabolites originaux.

Si l'utilisation en médecine des organismes marins, dont les macroalgues, est connue en Asie, et en Chine en particulier, depuis l'antiquité, ce n'est que depuis la moitié du 20^{ème} siècle, en particulier avec l'avènement des techniques contemporaines de récoltes, d'analyses et de criblages, que **l'industrie pharmaceutique s'intéresse à la mer comme source de molécules nouvelles, rares et actives** (Kornprobst 2005).

Deux médicaments, contenant des principes actifs d'origine marine, ont récemment été mis sur le marché : le Prialt[®] (en 2005) et le Yondelis[®] (en 2007). Le Prialt[®] ou ziconotide est l'équivalent synthétique d'une omega-conotoxine isolée du mollusque gastéropode *Conus magus* [6]. Le Yondelis[®] ou trabectédine appelé aussi ecteinascidine, a été isolé de l'ascidie *Ecteinascidia turbinata* (appartenant au groupe des tuniciers) [7].

Selon Ioannou et Roussis (2009), 3 554 articles scientifiques rapportant des activités biologiques de métabolites ou d'extraits algaux, ont été publiés depuis 2007 et au moins 3 280 composés issus des algues ont été décrits, soit environ 30% du nombre total de composés isolés d'organismes marins. Parmi les algues, les Phaeophyceae sont majoritairement étudiées par rapport aux algues vertes ou rouges (Kornprobst 2005, Ioannou et Roussis 2009). Néanmoins, les algues brunes ne sont que le quatrième groupe présentant le plus de composés bioactifs, après les éponges, les cnidaires et les algues rouges. Cela peut s'expliquer par le fait que les algues rouges présentent plus de composés azotés et/ou halogénés que les algues brunes (Kornprobst 2005).

Les activités les plus étudiées, toutes classes d'algues confondues, sont les activités cytotoxiques, antibiotiques et antifongiques ; puis viennent les activités anti-inflammatoires, antifouling, anti-VIH et enfin antioxydantes (Ioannou et Roussis 2009) (cf. Introduction Générale, Figure 5, p. 27). Concernant la famille

des Sargassaceae, les activités majoritairement étudiées sont les activités antimicrobiennes (incluant les activités antifongiques et antifouling) et les activités antioxydantes. Le Tableau 17 ci-après illustre la diversité des activités biologiques étudiées au sein de la famille Sargassaceae.

Tableau 17 : Exemples d'activités biologiques rencontrées au sein des Sargassaceae et principalement du genre *Sargassum*.

Activités biologiques	Références bibliographiques
Activité anticoagulante	Abdel-Fattah <i>et al.</i> 1973
Activité antimicrobienne	Sieburth et Conover 1965, Biard <i>et al.</i> 1980, Caccamese <i>et al.</i> 1981, Caccamese <i>et al.</i> 1985, Sreenivasa Rao <i>et al.</i> 1986, Sreenivasa Rao <i>et al.</i> 1988, Mahasneh <i>et al.</i> 1995, Rao 1996, Abourriche <i>et al.</i> 1999, Bennamara <i>et al.</i> 1999, Arun Kumar et Rengasamy 2000b, Arun Kumar et Rengasamy 2000a, Hellio <i>et al.</i> 2000, Hellio <i>et al.</i> 2001, Hellio <i>et al.</i> 2002, Zubia Arrieta 2003, Ely <i>et al.</i> 2004, Zinedine <i>et al.</i> 2004, Arunkumar <i>et al.</i> 2005, Engel <i>et al.</i> 2006, Patra <i>et al.</i> 2008, Zubia <i>et al.</i> 2008, Zubia <i>et al.</i> 2008, Bazes <i>et al.</i> 2009, Horie <i>et al.</i> 2009, Plouguerné <i>et al.</i> 2009
Activité antitumorale	Harada <i>et al.</i> 1997, Di Guardia <i>et al.</i> 1999, Ye <i>et al.</i> 2008, Moret <i>et al.</i> 2009 Parent-Massin <i>et al.</i> 1998, Deslandes <i>et al.</i> 2000, Maréchal <i>et al.</i> 2004, Moreau <i>et al.</i> 2006a
Activité antivirale	Caccamese <i>et al.</i> 1980, Caccamese <i>et al.</i> 1981, Arisawa <i>et al.</i> 1997, Hoshino <i>et al.</i> 1998, Hudson <i>et al.</i> 1999, Santos <i>et al.</i> 1999, Preeprame <i>et al.</i> 2001, Ahn <i>et al.</i> 2002, Akamatsu <i>et al.</i> 2003, Zhu <i>et al.</i> 2004, Iwashima <i>et al.</i> 2005b, Hayashi <i>et al.</i> 2006
Activité cytotoxique	Asari <i>et al.</i> 1989, Sheu <i>et al.</i> 1997, Sheu <i>et al.</i> 1999
Activité hypocholestéramiante	Revue dans Zubia Arrieta 2003
Activité hypoglycémiante	Revue dans Zubia Arrieta 2003
Activité antilarvicide de moustique	Subramonia Thangam et Kathiresan 1991, Tsukamoto <i>et al.</i> 1994
Activité lypolytique	Revue dans Zubia Arrieta 2003
Activité vermifuge	Revue dans Zubia Arrieta 2003
Activité antioxydante (dont activité antiradicalaire)	Yan <i>et al.</i> 1996, Anggadiredja <i>et al.</i> 1997, Matsukawa <i>et al.</i> 1997, Yan <i>et al.</i> 1998, Roberto <i>et al.</i> 2001, Lim <i>et al.</i> 2002, Wei et Shuguang 2002, Fisch <i>et al.</i> 2003, Mori <i>et al.</i> 2003, Zubia Arrieta 2003, Balaji Raghavendran <i>et al.</i> 2005, Iwashima <i>et al.</i> 2005b, Iwashima <i>et al.</i> 2005a, Jang <i>et al.</i> 2005, Nakai <i>et al.</i> 2006, Connan <i>et al.</i> 2007, Rastian <i>et al.</i> 2007, Zahra <i>et al.</i> 2007, Chandini <i>et al.</i> 2008, Le Lann <i>et al.</i> 2008a, Matanjun <i>et al.</i> 2008, Patra <i>et al.</i> 2008, Ye <i>et al.</i> 2008, Zubia <i>et al.</i> 2007, Zubia <i>et al.</i> 2008, Chattopadhyay <i>et al.</i> 2009, Heo et Jeon 2009
Activité anticholinestérase	Natarajan 2009
Activité de bioabsorption	Lodeiro <i>et al.</i> 2006
Activité antimototique	Valls <i>et al.</i> 1993

La famille Sargassaceae est une source intéressante de composés présentant un ou plusieurs activité(s) biologique(s). Ainsi, dans le cadre du volet 2C3 du programme CRISP (cf. Introduction générale), nous nous sommes intéressées à la recherche de composés bioactifs au sein de cette famille de Phaeophyceae.

Afin de répondre aux objectifs de ce projet, nous avons recherché au sein de différentes espèces de Sargassaceae en provenance des îles du Pacifique Sud des composés présentant potentiellement une activité anti-inflammatoire, cytotoxique et/ou neurotoxique. Des tests *in vitro* effectués en routine dans les laboratoires impliqués dans le programme CRISP ont été utilisés. A cela, nous avons rajouté une prospection de ces mêmes activités au sein des Sargassaceae du milieu tempéré préalablement étudiées au cours de ces travaux de thèse ainsi que la recherche de composés potentiellement antiradicalaires et/ou antioxydants.

Afin d'isoler des molécules actives, nous avons effectué une **extraction bioguidée** ou biodirigée qui consiste à réaliser systématiquement des tests de bioactivités sur un large panel d'extraits. Les étapes d'isolement, de purification et d'analyse structurales ne sont entreprises que sur les extraits montrant une activité significative. Cette démarche de bioguidage permet la mise en évidence d'activité(s) biologique(s) des substances d'origine marine, via des tests *in vitro*. Elle correspond à la première étape, fondamentale, de la recherche de nouvelle(s) molécule(s) active(s). C'est la phase initiale et indispensable d'un long processus de recherche et de développement. C'est cette démarche de bioguidage qui est également utilisée en industrie pharmaceutique (Kornprobst 2005).

1. Matériels et méthodes

1.1. Techniques de purification et d'analyses des biomolécules

Diverses méthodes de séparation et d'analyses de biomolécules (dont les principes de chaque technique sont détaillés en annexe III-1) ont été utilisées pour mener à bien ce travail.

Méthode de séparation chromatographique : Chromatographie d'absorption en phase normale et Chromatographie sur Couche mince

Méthodes d'analyses : Chromatographie sur Couche mince, Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, Résonance Magnétique Nucléaire

1.2.Criblage d'activités biologiques

1.2.1. Matériel biologique

Suivant la région étudiée, en milieux tempéré ou tropical, différents lots ont été constitués.

1.2.1.1. *Sargassaceae tempérées*

Des thalles de *Bifurcaria bifurcata*, *Cystoseira baccata* et *Sargassum muticum* ont été récoltés sur les sites de la Pointe du Diable et de Porsmeur en Novembre 2006 (cf. Chapitre I § 1.3 - Sites étudiés en Bretagne, p.46 pour la description des sites et Chapitre I § 2.5 - Description des espèces étudiées en Bretagne, p.67 pour celle des espèces). Ensuite, pour chaque espèce, 500 g de matériel frais a été récolté. De retour au laboratoire, les thalles ont été débarrassés des éventuels épiphytes, rincés à l'eau du robinet, puis à l'eau déionisée, essorés, séchés sur du papier absorbant et enfin conditionnés en lot de 100 g. Les lots ont ensuite été congelés à -25°C avant d'être lyophilisés puis conservés dans une boîte hermétique à l'abri de la lumière.

1.2.1.2. *Sargassaceae tropicales*

Chaque échantillon, en provenance des îles du Pacifique Sud et réceptionné lyophilisé en Métropole, a été utilisés (cf. Chapitre I, § 1.4 - Sites étudiés dans le Pacifique Sud, p.51 pour la description des sites et Chapitre I, § 2.6 - Description des espèces étudiées en Bretagne, p.74 pour celle des sites). Des lots de 30 g secs, soit l'équivalent de 100 g de matière fraîche ont été effectués puis conservés dans une boîte hermétique à l'abri de la lumière.

1.2.2. Extractions

Tous les échantillons provenant de milieux tempéré et tropical ont subi deux types d'extractions indépendantes afin d'isoler les composés polaires des composés apolaires.

1.2.2.1. Extraction de composés polaires

Une première extraction dite hydro-méthanolique a été réalisée sur les lots d'algues. Il s'agit de la même extraction utilisée pour extraire les composés phénoliques (cf. Chapitre II, § 1.3.1 - Extraction des composés phénoliques, p.91), c'est-à-dire une extraction via un mélange méthanol : eau (v:v) à raison de 3 g d'algue lyophilisée et grossièrement broyée pour 150 mL de solvant d'extraction. L'extraction a été réalisée à 40°C pendant 3 heures, sous agitation (60 t/m) et à l'abri de la lumière. Les extraits ont ensuite été centrifugés à 6500 g (Sigma 3K10, Osterode, Allemagne), filtrés sur coton de verre puis évaporés sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif (R-3000, Büchi, Flawil, Suisse). Le protocole d'extraction utilisé est celui décrit par Connan (2004).

1.2.2.2. Extraction de composés apolaires

Un second type d'extraction a été mené sur les lots d'algues lyophilisées afin d'isoler des composés apolaires. Il s'agit de l'extraction des lipides totaux présenté au Chapitre III, § 1.2.4 - Extraction des lipides, p. 185).

A noter que pour mener à bien les activités de bioguidage, nous sommes parties de 10 g de matière sèche. Tous les volumes de solvant ont été ajustés proportionnellement à la quantité d'algues utilisée.

1.2.3. Tests d'activités biologiques

1.2.3.1. Détermination de l'activité neurotoxique

L'activité neurotoxique des extraits de Sargassaceae a été déterminée par l'équipe du Professeur Jean-François Biard de l'ISOMER, situé à l'université de Nantes.

Le test neurotoxique utilisé est décrit par Zlotkin *et al.* (1971) et modifié par Denardou-Queneherve *et al.* (1999). Les extraits à tester sont solubilisés dans du DMSO à 10% ou du Tween 80 à 2% afin d'obtenir des solutions à 125 µg/µL. Les extraits sont ensuite injectés dans la partie ventrale du dernier segment abdominal des larves de diptère (*Lucilia sp.*). Le volume injecté est de 0,1 µL/mg de larve. Le test est considéré comme positif si l'immobilisation totale des larves est obtenue. Le délai (T) requis pour l'immobilisation est mesuré et l'activité correspondante (A) est calculée en utilisant la formule : $A = 500/T$ (Denardou-Queneherve *et al.* 1999, Landreau *et al.* 2002).

1.2.3.2. Détermination de l'activité anti-inflammatoire

L'activité anti-inflammatoire des extraits de Sargassaceae a été effectuée par Marie-Lise Bourguet-Kondracki et Arlette Longeon de l'unité MCAM « Molécules de Communication et Adaptation des Micro-organismes » FRE 3206 CNRS/MNHN, équipe de recherche MDCM « Molécules de défense et de communication dans les écosystèmes microbiens » du Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris.

L'activité anti-inflammatoire a été évaluée par l'inhibition de la phospholipase A₂ (Anti-PLA₂). Brièvement, ce test colorimétrique, décrit par Lobo de Araújo et Radvanyi (1987), utilise du rouge de phénol (ou phénolsulfonephtaléine ou PSP) comme indicateur de pH, et également du venin d'abeille (*Apis mellifera*, Sigma) comme source d'enzyme et de la lécithine (L- α -phosphatidylcholine, Sigma) comme substrat.

Les extraits testés sont dissous dans 2 μ L de DMSO et incubés en microplaques 96 puits pendant 1h à température ambiante avec 0,02 μ g/ μ L de PLA₂ de venin d'abeille. La réaction débute avec l'addition de 200 μ L de mélange réactionnel composé de lécithine à 3,5 mM, de Triton X à 7 mM ; de NaCl à 100 mM, de CaCl₂ à 10 mM et de rouge de phénol à 0,055 mM ajusté à une densité optique de 1,8 à 550 nm. L'absorbance est lue à 550 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (CERES 900 spectrophotomètre). La libération d'acide gras renseigne sur l'activité enzymatique, qui est calculée comme étant la différence d'absorbance entre le control et les échantillons testés à 0 et 5 min, avec une période de 30 secondes d'agitation à température ambiante.

1.2.3.3. Détermination de l'activité cytotoxique

L'activité cytotoxique a été déterminée par l'équipe de Thierry Cresteil de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN) de Gif sur Yvette.

L'activité cytotoxique a été testée selon le protocole décrit par Moret *et al.* (2009). Les lignées de cellules humaines du carcinome du larynx (cellules KB) sont incubées pendant 72h avec les extraits à différentes concentrations (10 μ g/mL et 1 μ g/mL). Le volume final est obtenu avec le milieu de culture contenant 1% de DMSO. Du docétaxel (substance active anticancéreuse) est utilisé comme témoin positif. L'inhibition de la croissance cellulaire est déterminée en utilisant le test MTS selon les recommandations du fabricant (Promega). Le MTS (ou MTS tetrazolium) est bioréduit en formazan par les cellules. Cette conversion est accomplie par la déshydrogénase trouvée dans les cellules métaboliquement actives. Ainsi la

production de formazan est proportionnelle au nombre de cellules vivantes et l'intensité de la couleur produite est un bon indicateur de la viabilité des cellules. La densité optique est mesurée à 490 nm. L'index de cytotoxicité est un pourcentage, calculé comme suit :

$$\frac{\text{DO des cellules traitées (extraits)}}{\text{DO des cellules du control}} \times 100$$

1.2.3.4. Détermination de l'activité anti-radicalaire par la méthode du DPPH

Cette méthode est basée sur l'utilisation d'un radical libre, stable en solution : le 2,2 diphényl-1-picrylhydrazyl ou DPPH (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) et est décrite au Chapitre II, § 1.4.3.1 - Détermination de l'activité anti-radicalaire par le test du DPPH, p.94.

1.2.3.5. Détermination de l'activité anti-oxydante par la méthode du β -carotène sur microplaque

Cette méthode est basée sur la décoloration du β -carotène par l'acide linoléique et est décrite au Chapitre II, § 1.4.3.2 - Détermination de l'activité antioxydante par la méthode des β -carotène sur microplaque, p.95).

1.3. Isolement de biomolécules actives par bio-guidage

1.3.1. Molécules à activité anti-inflammatoire

Suite aux premiers résultats obtenus pour les différents tests d'activités, nous avons sélectionné deux des extraits présentant les plus fortes activités.

Pour chacun de ces deux échantillons, 1 g d'extrait sec a été fractionné par chromatographie ouverte sur colonne de silice (Silicagel 60, 0,600-0,043 nm, Merck, Germany) via un gradient de solvant allant de l'hexane 100% au méthanol 100% en passant par de l'acétate d'éthyle 100%. Ainsi, 5 fractions ont été récupérées : la fraction 1 éluée à l'hexane 100% ; la fraction 2 éluée à l'hexane : acétate d'éthyle (50:50, v:v), la fraction 3 éluée à l'acétate d'éthyle 100%, la fraction 4 éluée à l'acétate d'éthyle : méthanol (50:50, v:v) et la fraction 5 éluée au méthanol 100% (Figure 83).

L'activité anti-inflammatoire des fractions et de l'extrait brut a été testée afin de s'assurer de la pérennité de cette activité au cours du processus de purification. Pour chaque échantillon de départ (ou extrait brut) la fraction la plus active a été sélectionnée et a ensuite été analysée en GC/MS (Figure 83).

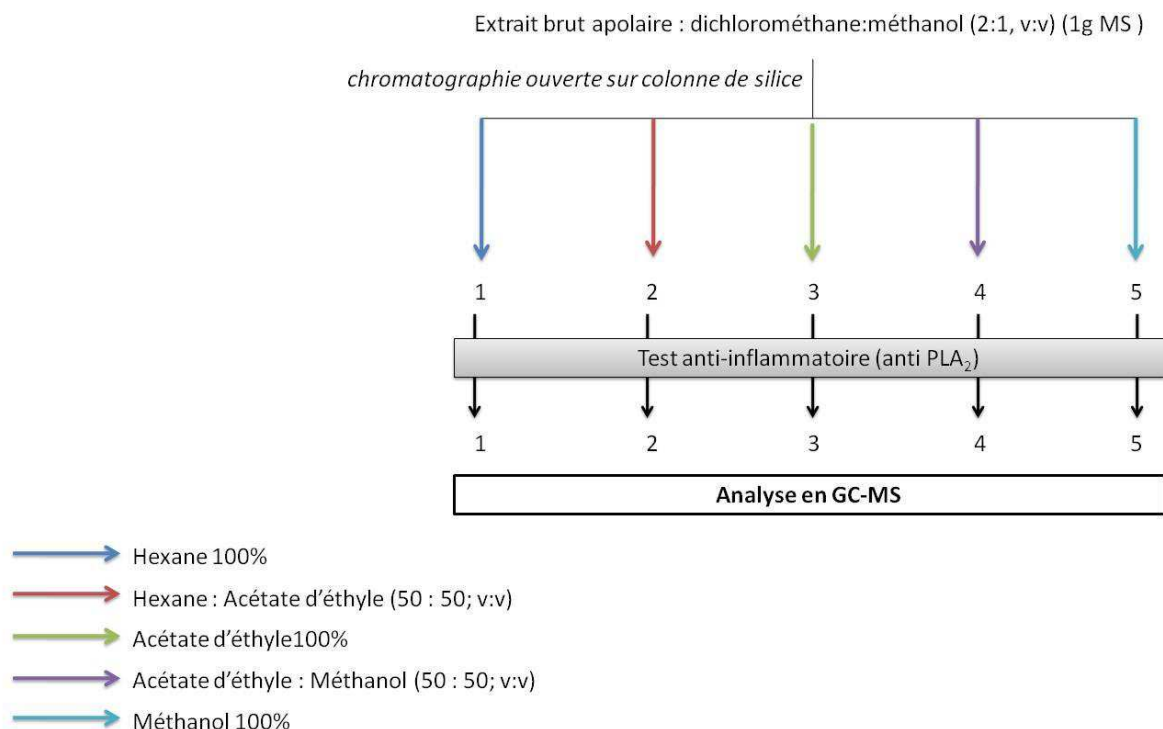


Figure 83 : Schéma synthétique des travaux de purification des extraits anti-inflammatoires de Sargassaceae tropicales

1.3.2. Molécules à activité anti-radicalaire

L'ensemble des travaux de purification et d'identification entrepris afin d'identifier une ou plusieurs molécules à activité anti-radicalaire est présenté à la Figure 84.

Parmi les extraits bruts apolaires actifs, nous avons sélectionné l'extrait le plus actif que nous avons fractionné par Flash Chromatographie sur cartouche de 30 g de C18 selon le protocole utilisé par l'équipe « Biomolécules et activité antifouling » du laboratoire MAPIEM (Laboratoire Matériaux Polymères - Interfaces - Environnement Marin, Unité de recherche EA 4323) de l'Université du Sud – Toulon – Var. Un dépôt sec est effectué avec 1 g d'extrait sec mélangé à 2 g de C18, puis l'élution s'effectue par un gradient de solvants allant de l'eau : méthanol (80:20, v:v) au dichlorométhane 100%. Le protocole est détaillé en annexe IV-1. Ainsi, 68 à 70 fractions ont été récupérées.

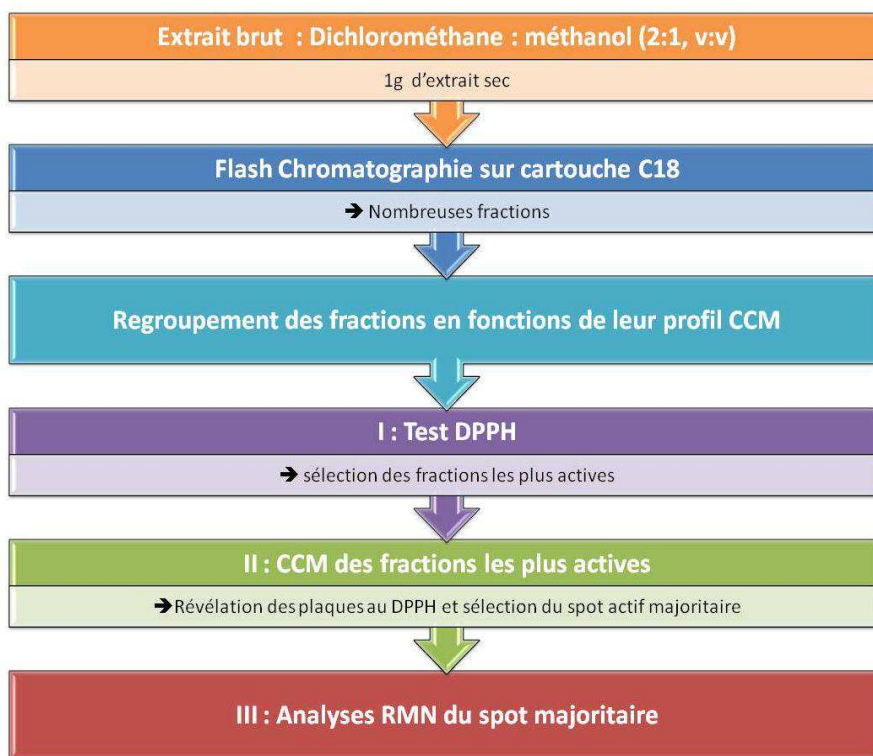


Figure 84 : Schéma synthétique des travaux de purification entrepris sur les extraits apolaires de *Bifurcaria bifurcata* en provenance de la Pointe du Diable (A) et de Porsmeur (B) et présentant une activité anti-radicalaire.

Ces fractions ont été analysées en CCM. Les fractions présentant des spots identiques au niveau de leur R_f , ont été regroupées puis le pouvoir antiradicalaire de chacune des fractions ainsi regroupées a été testé via un test DPPH sur microplaque (cf. protocole présenté au Chapitre II, § 1.4.3.1 - Détermination de l'activité anti-radicalaire par le test du DPPH, p.94) et les fractions les plus actives ont été sélectionnées pour des analyses complémentaires en CCM.

Pour ces analyses complémentaires en chromatographie sur couche mince, nous avons utilisé des plaques de silicagel (Silicagel 60 F254, Merck) comme phase stationnaire et un mélange de solvant composé d'hexane et d'acétate d'éthyle à part égale (50:50, v:v) comme phase mobile. Comme certaines des fractions sélectionnées présentaient une couleur orangée typique de la fucoxanthine, nous avons également déposé de la fucoxanthine préalablement purifiée sur la plaque CCM afin de vérifier la présence de ce composé au sein des fractions orangées.

Après migration, les plaques CCM ont été révélées aux UV (365 nm) et au DPPH (solution à 80 µg/mL). Le spot le plus important et présentant une forte activité antiradicalaire a été sélectionné pour analyse complémentaire en RMN (Figure 84).

1.4.Purification de biomolécules

1.4.1. Purification de la fucoxanthine

Le protocole de purification de la fucoxanthine a été adapté de Yan *et al.* (1999) et de Mori *et al.* (2004) et présenté à la Figure 85.

Des thalles de *Sargassum muticum*, représentant 1 kg de matériel frais, ont été récoltés en Avril 2008 à la Pointe du Diable. Les thalles ont été débarrassés des éventuels épiphytes, rincés à l'eau du robinet, puis à l'eau déionisée, essorés, séchés sur du papier absorbant et enfin conditionnés en lot de 100 g. Les lots ont ensuite été congelés à -25°C, lyophilisés puis conservés dans une boîte hermétique à l'abri de la lumière. Ensuite, 2 lots de 100 g, soit 39 g de matériel sec ont été utilisés pour la purification de la fucoxanthine. Le matériel sec (39 g) a été broyé au blender puis à l'ultra-turax avec 900 mL de solvant apolaire (dichlorométhane : méthanol, (1:2 ; v:v)). Le mélange a ensuite subi 15 min d'ultrasons en chambre froide et à l'obscurité. Après filtration sur coton de verre, le solvant a été évaporé. Ainsi, 6,4 g d'extrait brut sec ont été obtenus. Ensuite, 1,4 g ont été repris dans une dizaine de millilitres de solvant d'extraction, puis 2 à 3 g de silice (Silicagel 60, 0,200 à 0,064 nm) ont été rajoutés à cet extrait. Le solvant a été de nouveau évaporé. Le mélange extrait/silice obtenu a permis d'effectuer un dépôt sec sur le sommet d'une colonne de silice (Silicagel 60, 0,200 à 0,064 nm) de 30 cm de haut et de diamètre 2,6 cm préalablement conditionnée avec le solvant d'élution suivant : hexane:acétate d'éthyle (1:1, v:v). L'élution a été effectuée avec un flux d'environ 9 mL/min. La 3^{ème} fraction, de couleur orange foncé, a été récupérée et passée en RMN du proton pour vérifier la présence de la fucoxanthine (Figure 85). Après vérification et évaporation du solvant deutéré, la fraction (20mg sec) a été reprise dans 1,5 mL de méthanol et déposée au sommet d'une colonne de silice (Silicagel 60, 0,200 à 0,064 nm) de 18 cm de haut et de 1 cm de diamètre, préalablement conditionnée avec le solvant d'élution : hexane:acétate d'éthyle (1:1, v:v). L'élution a été effectuée avec un flux d'environ 1,5 mL/min. La 3^{ème} fraction, de couleur orange foncé, a été récupérée et passée en RMN du proton pour vérifier la présence de la fucoxanthine. La RMN a confirmé la présence de la fucoxanthine dans la fraction, néanmoins elle a aussi montré la présence d'autres composés (essentiellement des acides gras) dans la fraction. Cette dernière a donc été purifiée par CCM (sur plaque de silice) et la bande la plus orange a été prélevée par grattage de la silice. La fucoxanthine a été dissoute dans du méthanol sous agitation pendant 5 min, puis filtrée sur microfibre de verre sur pompe à vide. Après évaporation du méthanol, 8,5 mg de fucoxanthine ont été obtenus. Enfin, 3,5 mg ont été repris dans du méthanol de type « HPLC » et les 5 mg restant ont servi aux manipulations de RMN 2D afin d'identifier l'isomère de fucoxanthine (Figure 85).

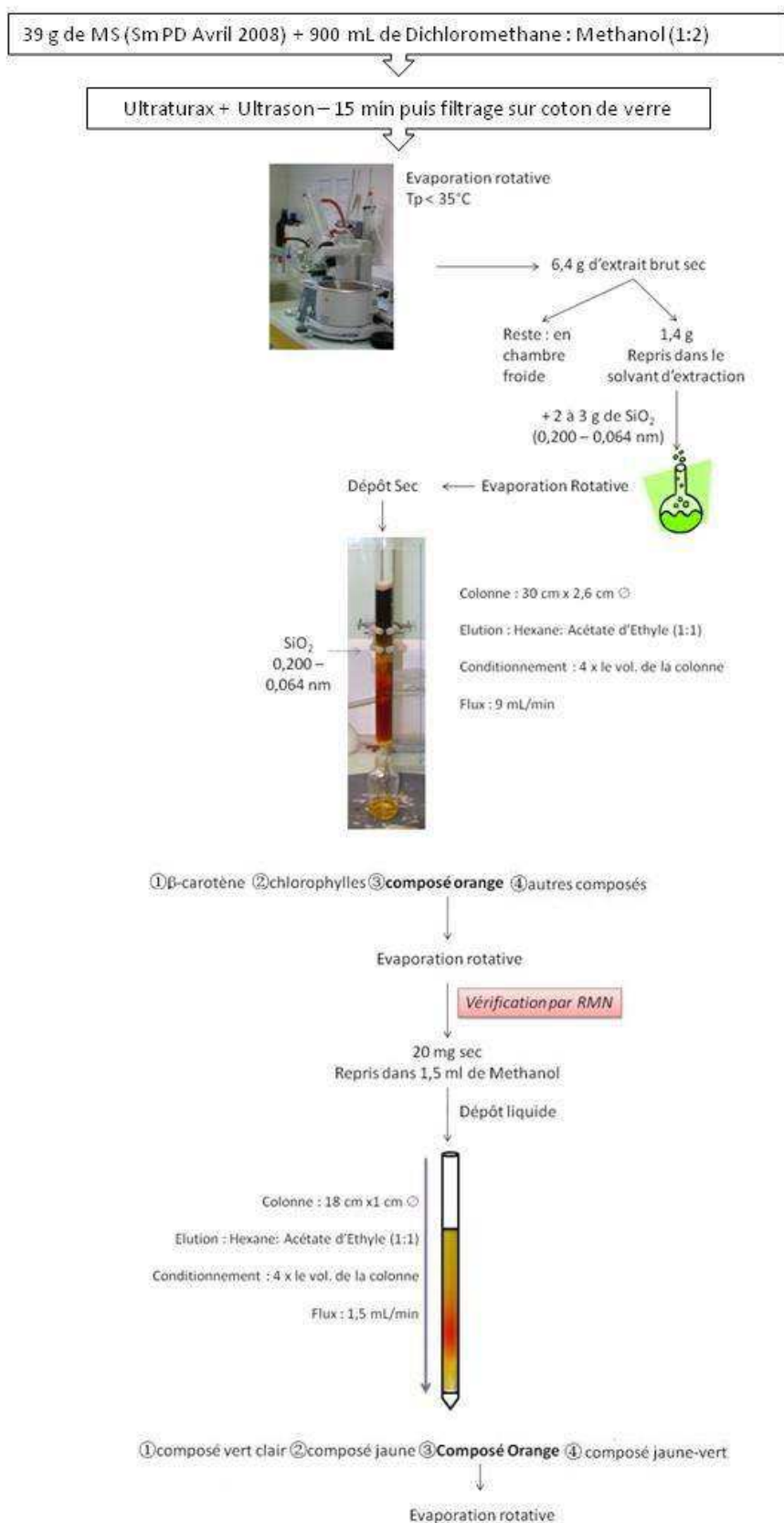


Figure 85 : Protocole de purification de la fucoxanthine, PD : Pointe du Diable.

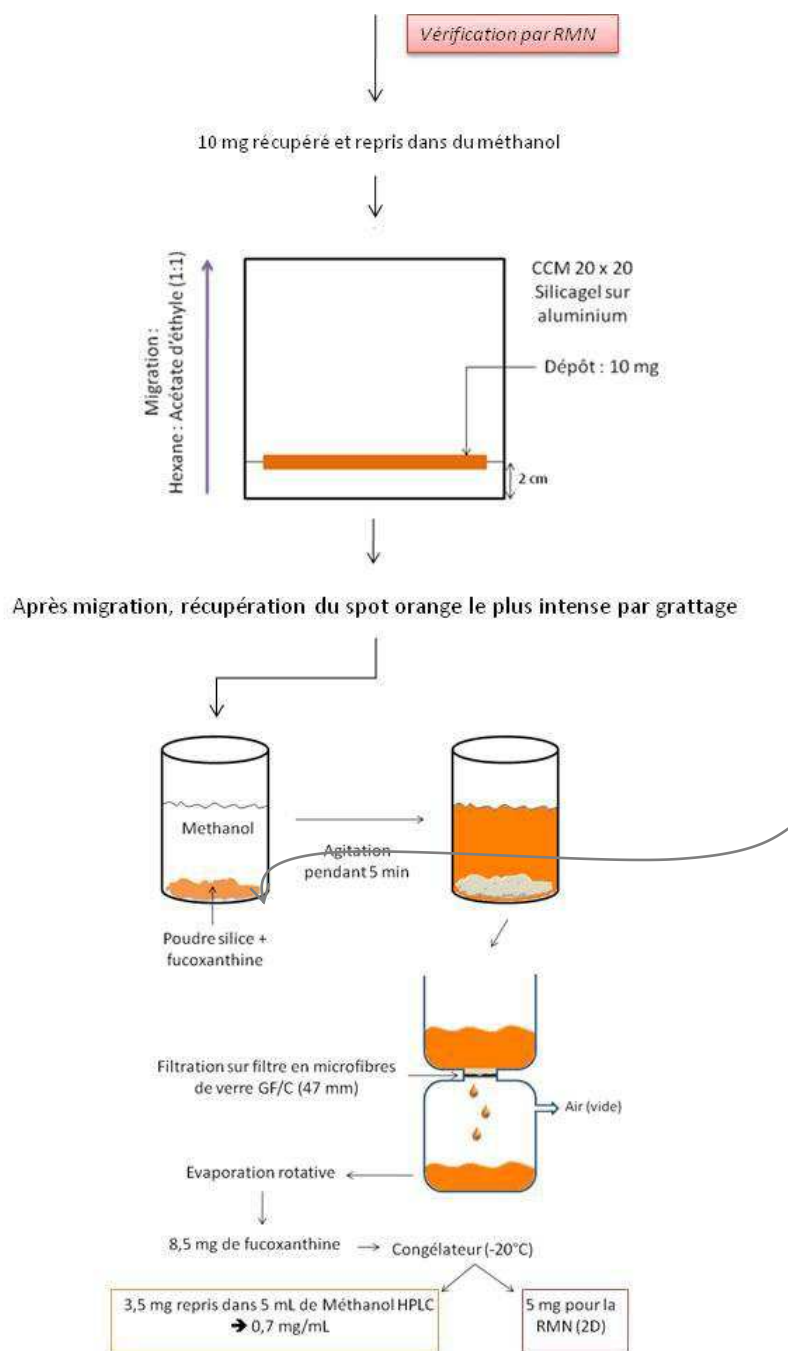


Figure 86 (suite) : Protocole de purification de la fucoxanthine, PD : Pointe du Diable (suite).

1.4.2. Tests d'activité des chimiomarqueurs identifiés

Les fractions contenant les chimiomarqueurs identifiés au Chapitre III ont été testées pour la présence éventuelle d'activités antiradicalaire, antioxydante, anti-inflammatoire, cytotoxique et neurotoxique. Il s'agit des fractions Tc-CCM-3, To-CCM-3 et B-BbPM. Leur signification est rappelée dans le Tableau 18.

Tableau 18 : Récapitulatif des fractions contenant les chimiomarqueurs identifiés au Chapitre III (en gras) et testées en activités antiradicalaire, antioxydant et anti-inflammatoire ainsi qu'en cytotoxicité et en neurotoxicité.

Code de la fraction	Espèce (site de prélèvement)	Composition de la fraction (cf. Chapitre III)
Tc-CCM-3	<i>Turbinaria conoides</i> (Ouiné, Nouvelle Calédonie)	acide palmitique, acide myristique, acide oléique, acide palmitélaïdique et acide turbinarique
To-CCM-3	<i>Turbinaria ornata</i> (Ouiné, Nouvelle Calédonie)	acide palmitique, acide myristique, acide oléique, acide palmitélaïdique et acide stéarique
B-BbPM	<i>Bifurcaria bifurcata</i> (Porsmeur, Bretagne)	Bifurcanone

2. Résultats

2.1. Criblage d'activités biologiques des Sargassaceae tropicales

Parmi tous les extraits testés (Tableau 19), seuls deux présentent une activité neurotoxique. Il s'agit des extraits polaires de *Turbinaria ornata* et *Sargassum polycystum* de Kakaulevu et Visogo respectivement (Vanua Levu, îles Fidji). Ces extraits ne présentent pas d'activité cytotoxique ni anti-inflammatoire (anti-PLA₂).

Concernant l'activité cytotoxique (Tableau 19), un seul extrait présente une activité significative (> 80%) à 10 µg/mL, néanmoins, cette activité est perdue lorsque l'extrait est testé à une concentration plus faible (à 1 µg/mL). Il s'agit de l'extrait apolaire de *Sargassum cristaefolium* récoltée à Anuta Paina Island (îles Salomon). Cet extrait ne montre aucune autre activité, ni neuro-toxique, ni anti-inflammatoire.

D'un point de vue général, les extraits apolaires sont plus actifs que les extraits polaires. Sauf aux îles Fidji, où ce sont les extraits polaires qui présentent une activité anti-PLA₂. Cependant, cette activité étant < à 80%, elle n'est pas considérée comme significative dans le cadre de notre étude (Tableau 19).

De plus, il est intéressant de remarquer que :

- l'extrait hydrométhanolique de *Turbinaria ornata* des îles Fidji présente à la fois une activité neurotoxique, cytotoxique et anti-inflammatoire. Néanmoins ni l'activité cytotoxique, ni l'activité anti-inflammatoire ne sont significatives.

- les extraits apolaires de *Turbinaria decurrens* d'Anuta Paina Island, de *T. conoides* de Lau Lagoon (îles Salomon) et de *Sargassum aquifolium* de Prony 1 (Nouvelle Calédonie) montrent une activité anti-inflammatoire alors que ceux de *T. decurrens* de Lau Lagoon, de *T. conoides* de Nggela NW (îles Salomon) et de *S. aquifolium* de Prony 2 (Nouvelle Calédonie) ne présentent aucune activité anti-PLA₂ significative.

Nous avons retenu pour la suite du Chapitre les extraits encadrés en orange dans le Tableau 19, à savoir, les extraits bruts apolaires de *Turbinaria conoides* de Lau Lagoon (îles Salomon) et de *Sargassum aquifolium* d'Anuta Paina island (îles Salomon). Ces extraits ont été sélectionnés car il s'agissait des premiers résultats positifs obtenus. En effet, suite à la campagne de collecte organisée dans le cadre du projet CRISP/AFD, les échantillons des îles Salomon ont été les premiers réceptionnés.

2.2.Criblage d'activités biologiques des Sargassaceae tempérées

Concernant le criblage des activités biologiques des Sargassaceae tempérées (Tableau 20), deux extraits hydrométhanoliques présentent une activité cytotoxique. Il s'agit des extraits de *Bifurcaria bifurcata* et de *Cystoseira baccata* récoltées à la Pointe du Diable. Cependant, l'activité cytotoxique de ces deux extraits n'est pas considérée comme active car elle est inférieure à 80% d'inhibition cellulaire. Ces deux extraits ne présentent aucune autre activité.

D'un point de vue général, les extraits apolaires sont plus actifs que les extraits polaires (Tableau 20). En effet, seuls les extraits au dichlorométhane:méthanol (2:1 , v:v) présentent une activité anti-inflammatoire significative. A la pointe du Diable, les extraits apolaires de *Sargassum muticum* et de *Bifurcaria bifurcata* montrent une activité légèrement supérieure à celle des extraits de *Cystoseira baccata* (avec respectivement 99%, 97% et 93% d'inhibition de la PLA₂). A Porsmeur, les trois espèces montrent des activités anti-inflammatoires similaires avec 94% d'inhibition de la PLA₂ pour *Sargassum muticum* et *Cystoseira baccata* et 95% pour *Bifurcaria bifurcata*.

De plus, il est intéressant de remarquer que, contrairement au milieu tropical, nous n'observons pas de variations inter- ou intraspécifiques des activités testées.

Tableau 19 : Criblage d'activités effectué sur les extraits polaires (hydrométhanolique) et sur les extraits apolaires (dichlorométhane:méthanol) de la majorité des échantillons algaux de milieu tropical. nd : non déterminée ; - : pas d'activité détectée ; HA : hyper activité des larves de diptères.

Extraits bruts	Site de prélèvement		Genre	Espèce	Tests			
	Archipel	Localité			Neuro- toxique (A)	Cytotoxicité (% inhibition) 10 µg/mL 1µg/mL	Anti- inflammatoire (% inhibition) 400 µg/mL	
Méthanol 50	îles Salomons	Lau Lagoon	Turbinaria	decurrens	-	50	10	-
		Nggela NW	Turbinaria	conoides	-	-	-	-
		Lau Lagoon	Turbinaria	conoides	-	72	-	-
		Anuta Paina Island	Turbinaria	ornata	-	-	-	-
		Anuta Paina Island	Turbinaria	decurrens	-	-	-	-
		Nggela NW	Sargassum	aquifolium	-	64	24	-
		API	Sargassum	cristaefolium	-	100	-	-
		Anuta Paina Island	Sargassum	aquifolium	-	54	63	-
		Lau Lagoon	Sargassum	aquifolium	-	-	-	-
		Lau Lagoon	Turbinaria	decurrens	-	-	-	-
Dichlorométhane:Méthanol (2:1)	îles Salomons	Nggela NW	Turbinaria	conoides	-	-	-	-
		Lau Lagoon	Turbinaria	conoides	-	-	-	97
		Anuta Paina Island	Turbinaria	ornata	-	-	-	88
		Anuta Paina Island	Turbinaria	decurrens	-	-	-	94
		Nggela NW	Sargassum	aquifolium	-	67	8	81
		Anuta Paina Island	Sargassum	cristaefolium	-	-	-	93
		Anuta Paina Island	Sargassum	aquifolium	-	-	-	96
		Lau Lagoon	Sargassum	aquifolium	-	-	-	89
Méthanol 50	îles Fidji	Vanua Levu (Kakaulevu)	Turbinaria	ornata	50	71	-	79
		Vanua Levu (Visogo)	Sargassum	polycystum	20	-	-	76
		Vanua Levu (Namukalau)	Sargassum	polycystum	-	-	-	71
		Ngau (Navukailagi)	Sargassum	polycystum	-	-	-	51
		Vanua Levu (Kakaulevu)	Turbinaria	ornata	-	-	-	-
Dichlorométhane:Méthanol (2:1)	îles Fidji	Vanua Levu (Visogo)	Sargassum	polycystum	-	-	-	-
		Vanua Levu (Namukalau)	Sargassum	polycystum	-	-	-	-
		Ngau (Navukailagi)	Sargassum	polycystum	-	-	-	-

Méthanol 50	Nouvelle Calédonie	Prony 1	<i>Sargassum</i>	<i>aquifolium</i>	-	-	-	-
		Prony 2	<i>Sargassum</i>	<i>aquifolium</i>	-	-	-	86
		Ouiné	<i>Turbinaria</i>	<i>conoides</i>	-	-	-	80
		Prony 2	<i>Turbinaria</i>	<i>conoides</i>	HA	-	-	94
		Ouiné	<i>Turbinaria</i>	<i>ornata</i>	-	-	-	-
Dichlorométhane:Méthanol (2:1)		Prony 1	<i>Sargassum</i>	<i>aquifolium</i>	-	-	-	99
		Prony 2	<i>Sargassum</i>	<i>aquifolium</i>	-	-	-	-
		Ouiné	<i>Turbinaria</i>	<i>conoides</i>	-	-	-	100
		Prony 2	<i>Turbinaria</i>	<i>conoides</i>	-	-	-	96
		Ouiné	<i>Turbinaria</i>	<i>ornata</i>	-	-	-	100

Tableau 20 : Criblage d'activités effectué sur les extraits polaires (hydrométhanolique) et sur les extraits apolaires (dichlorométhane : méthanol) de la majorité des échantillons algaux de milieu tempéré. nd : non déterminée ; - : pas d'activité détectée.

Extraits Bruts	Site de prélèvement	Genre	espèce	Tests			
				Neuro- toxique (A)	Cytotoxicité (% inhibition)		anti-Inflammatoire (% inhibition) 400 µg/mL
					10 µg/mL	1µg/mL	
Méthanol 50	Pointe du Diable	<i>Sargassum</i>	<i>muticum</i>	nd	-	nd	-
		<i>Bifurcaria</i>	<i>bifurcata</i>	nd	77	nd	-
		<i>Cystoseira</i>	<i>baccata</i>	nd	17	nd	-
Dichlorométhane: Méthanol (2:1)		<i>Sargassum</i>	<i>muticum</i>	nd	-	nd	99
		<i>Bifurcaria</i>	<i>bifurcata</i>	nd	-	nd	97
		<i>Cystoseira</i>	<i>baccata</i>	nd	-	nd	93
Méthanol 50	Porsmeur	<i>Sargassum</i>	<i>muticum</i>	nd	-	nd	-
		<i>Bifurcaria</i>	<i>bifurcata</i>	nd	-	nd	-
		<i>Cystoseira</i>	<i>baccata</i>	nd	-	nd	-
Dichlorométhane: Méthanol (2:1)		<i>Sargassum</i>	<i>muticum</i>	nd	-	nd	95
		<i>Bifurcaria</i>	<i>bifurcata</i>	nd	-	nd	94
		<i>Cystoseira</i>	<i>baccata</i>	nd	-	nd	95

2.3. Isolement de biomolécules actives par bio-guidage

2.3.1. Isolement de molécule(s) à activité anti-inflammatoire

Les résultats de cette étude font l'objet d'un manuscrit qui sera soumis à **Pharmacological Research**. La référence de cet article, présenté p. 265, est :

Le Lann K, Bourguet-Kondracki ML, Longeon A, Ioannou E, Roussis V, Payri C & V Stiger-Pouvreau (à soumettre) Potent anti-inflammatory active compounds isolated from marine brown algae (Sargassaceae, Fucales) collected in the Solomon Islands, South Pacific. Pharmacological Research.

Les résultats de cette étude ont montré que seuls les extraits apolaires présentaient une activité anti-phospholipase A₂ (anti-PLA₂). Parmi les extraits bruts actifs, nous avons sélectionné les deux extraits qui présentaient la plus forte activité afin d'isoler les composés actifs. Il s'agit des extraits bruts apolaires de *Turbinaria conoides* en provenance de Lau Lagoon et de *Sargassum aquifolium* récoltée à Anuta Paina Island. Après avoir fractionné les extraits bruts sur colonne de gel de silice, nous avons testé l'activité anti-PLA₂ sur les 5 fractions obtenues pour chaque espèce sélectionnée. Pour les deux espèces sélectionnées, la fraction 5 (Méthanol 100%) est la plus active (Figure 86). Les analyses en GC-MS effectuées sur ces fractions 5 ont permis de révéler la présence de 3 acides gras dans la fraction de *Sargassum aquifolium* et de 4 acides gras pour la fraction de *Turbinaria conoides*. Ces acides gras sont, chez *Sargassum aquifolium*, l'acide palmitique, l'acide stéarique et l'acide oléique (Figure 86). Chez *Turbinaria conoides*, ces 3 mêmes acides gras sont retrouvés, avec en plus de l'acide linoléique (Figure 86).

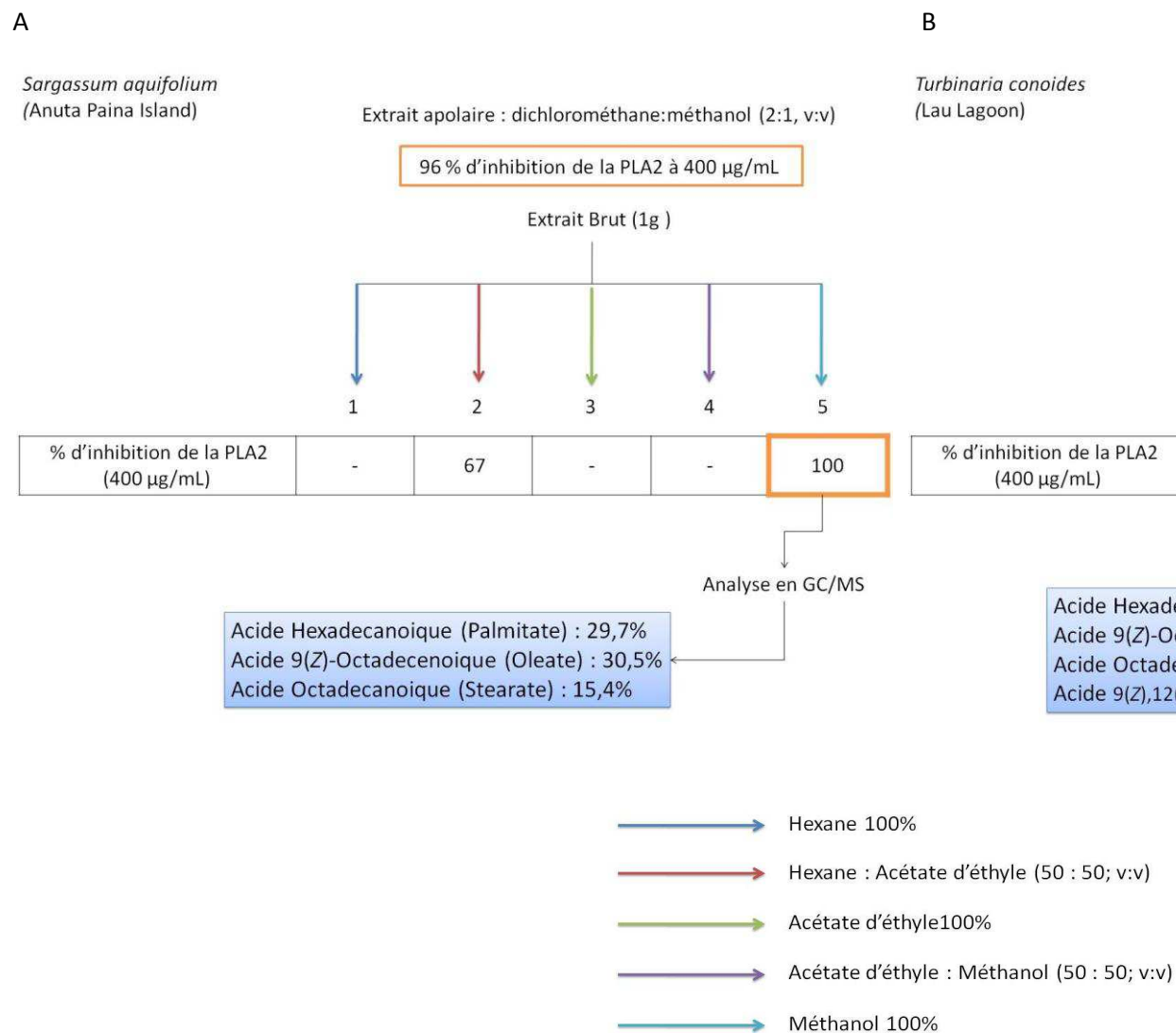


Figure 86 : Bioguidage concernant les extraits apolaires de *Sargassum aquifolium* (A) et de *Turbinaria conoides* (B) récoltées aux îles Salomon (Anuta Paina Island) et présentant une activité anti-inflammatoire. PLA₂ : phospholipase₂.

Potent anti-inflammatory active compounds isolated from marine brown algae (Sargassaceae, Fucales) collected in the Solomon Islands, South Pacific

Klervi Le Lann¹, Marie-Lise Bourguet-Kondracki², Arlette Longeon², Efstathia Ioannou³, Vassilios Roussis³, Claude Payri⁵, Valérie Stiger-Pouvreau¹

¹LEBHAM, EA 3877, IUEM, Technopôle Brest Iroise, 29280 Plouzané, France

² Muséum national d'Histoire Naturelle, FRE 3206 CNRS/MNHN, unité MCAM « Molécules de Communication et Adaptation des Micro-organismes », équipe de recherche MDCM « Molécules de défense et de communication dans les écosystèmes microbiens », 57 rue Cuvier (CP 54), 75005 Paris, France

³University of Athens, School of Pharmacy, Department of Pharmacognosy and Chemistry of Natural Products, Parepsitimiopolis Zografou, Athens 157 71, Greece

⁵UMR 7138/"Systématique, Adaptation, Evolution", IRD, B.P. A5, 98848, Nouméa Cedex, Nouvelle-Calédonie & UPF, French Polynesia

E-mail : klervi.lelann@gmail.com

Abstract

Phytochemical investigations of two brown macroalga species belonging to the two genera *Sargassum* and *Turbinaria* from Solomon Islands resulted in the isolation of potent anti-inflammatory (anti-phospholipase A₂) activity fatty acids. Among the 5 considered species, extracts from *Turbinaria conoides* and *Sargassum aquifolium* were selected for further active compounds isolation. The most active fractions were the MeOH ones, in which 3 fatty acids in *S. aquifolium* and 4 in *T. conoides* are commonly present. Isolation and identification of the anti-inflammatory fatty acids using GC/MS technics are presented and discussed.

Keywords : *Sargassum* sp., *Turbinaria* sp., Fatty acids, anti-inflammatory, anti-PLA₂

Introduction

The genera *Sargassum* and *Turbinaria* are brown seaweeds belonging to the family Sargassaceae (Fucales, Phaeophyceae). This family has a worldwide distribution and is composed of 488 species distributed in all oceans, except Antarctica (Phillips 1995, Guiry and Guiry 2009). If the genus *Sargassum* is distributed in temperate and tropical area with 352 species, *Turbinaria* is a strictly tropical and sub-tropical genus with only 22 known species.

In the last decades, *Sargassum* species have been reported to present various bio-activities like, larvicidal properties (Tsukamoto *et al.* 1994, Subramonia Thangam and Kathiresan 1991), antibacterial activities (e.g.: Sreenivasa Rao *et al.* 1986, Sreenivasa Rao *et al.* 1988, Arun Kumar and Rengasamy 2000, Arunkumar *et al.* 2005), antifouling activities (Plouguerné *et al.* 2008, Bazes *et al.* 2009, Plouguerné *et al.* 2009), toxicity against brine shrimp (Ara *et al.* 1999), cytotoxicity (Numata *et al.* 1991, Numata *et al.* 1992, Takada *et al.* 2001, Tang *et al.* 2002), anti-viral activities (Hudson *et al.* 1999, Hayashi *et al.* 2006), antioxidant activities (e.g.: Balaji Raghavendran *et al.* 2005, Zahra *et al.* 2007, Chandini *et al.* 2008, Matanjun *et al.* 2008, Heo and Jeon 2009), hepatoprotective effects (Park *et al.* 1997), anti-coagulant activity (Koo *et al.* 2001), immune resistance of white shrimp (Yeh *et al.* 2006), antipyretic and analgesic activities (Kang *et al.* 2008). Moreover, two recent works have reported the anti-inflammatory activities of some extracts of *Sargassum wightii* (Greville) J. Agardh (Dar *et al.* 2007), *Sargassum fulvellum* (Turner) C. Agardh and *Sargassum thunbergii* (Roth) Kuntze (Kang *et al.* 2008).

Concerning the genus *Turbinaria*, antioxidant activities (Chandini *et al.* 2008, Zubia *et al.* 2008, Chattopadhyay *et al.* 2010), cytotoxic activities (Asari *et al.* 1989, Sheu *et al.* 1997, Sheu *et al.* 1999, Deslandes *et al.* 2000), larvicidal properties (Subramonia Thangam and Kathiresan 1991) and feeding deterrent against grazers (Sawai *et al.* 1994) have been reported.

Considering the literature, there is no report regarding the anti-phospholipase A₂ activity of polar and non-polar extracts derived from various *Sargassum* and *Turbinaria* species. Phospholipase A₂ (PLA₂) specifically catalyses hydrolysis of esters of phospholipids to produce lysophospholipids and free fatty acids (Potts *et al.* 1992). The fatty acids, and especially those derived from the arachidonic acid metabolism, are the substrate for the biosynthesis of eicosanoids which are known to mediate inflammation (Calder 2009b). Based on this mode of action, compounds that inhibit PLA₂ activity have been targeted as potential therapeutic agents in the treatment of inflammation.

This project is part of the Coral Reef Initiative in the South Pacific (CRISP), and involves research into active compounds isolated from marine organisms. In South Pacific Islands, brown macroalgae belonging to the family Sargassaceae can form large beds in coral reef areas and can dominate their environment (Phillips 1995, Mattio 2008). With the objective of making valuable use of the high biomass of Sargassaceae species found in tropical areas, *Sargassum* and *Turbinaria* species were collected in the Solomon Islands and the potent anti-inflammatory activity of their polar and non-polar extracts was screened by evaluating their anti-PLA₂ activity.

Material and Methods

Algal collection

The two genera under study are *Sargassum* and *Turbinaria*. The former presents a multi-axial arrangement with several flexible laterals, whereas the latter shows a single axial arrangement with a major rigid and erect axis. Adult specimens of two species of *Sargassum* (*S. aquifolium* (Turner) C. Agardh and *S. cristaefolium* C. Agardh) and three species of *Turbinaria* (*T. ornata* (Turner) J. Agardh, *T. conoides* (J. Agardh) Kützinger and *T. decurrens* Bory de Saint-Vincent) living in the Solomon Islands were collected over the austral winter in July 2004 (Table 1). The field-collected samples were freeze-dried and sent to the first author.

Extraction

Polar extracts were obtained from 3g of each freeze-dried sample in a methanol/water mixture (50/50, v/v) at 40°C for 3 h under rotary agitation (60 rpm). The samples were centrifuged at 6 500 g (Sigma 3K10, Osterode, Germany) and evaporated at 40°C under vacuum with a Rotavapor system (R-3000, Büchi, Flawil, Switzerland) as described by Le Lann *et al.* (2008a).

Non-polar extracts were constituted from a three-times extraction using 10g of each freeze-dried sample in 100 mL from a dichloromethane/methanol mixture (2/1, v/v). The extract was then filtered and the filter was rinsed with 10 mL of solvent of extraction. 60 mL of 0.75 % NaCl is added. The extract mixture was stored 2 hours in 4°C and shielded from the light. After degassing, the organic phase was got back and the solvent was eliminated under diminished pressure. About 70 to 100 mg resulted dried extracts were obtained.

Fractionation

Silica-gel gravity chromatography (Kieselgel 60H, 0,063-0,200 mm, Merck) was performed in the separation process. Samples (30 mg) were deposited up the column and eluted with a gradient of hexane/ethyl acetate (EtOAc) and EtOAc/methanol (MeOH) (Figure 1).

Five fractions (100 mL each) were collected in a step gradient elution starting with Hexane 100% and ending with MeOH 100%. Each fraction was tested against the Phospholipase A₂, as mentioned above (Figure 1).

Structural Analyses

Gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) analyses were carried out using a Hewlett-Packard 5973-6890 GC–MS system operating in electron ionization mode at 70 eV, equipped with a split–splitless injector. Injector was set at 230°C in a split ratio 1:10.

The column employed for the analysis was a HP-5 MS fused silica capillary column (30 m× 0.25 mm, film thickness 0.25µm). The carrier gas was helium at a flow rate of 1 mL/min. The oven temperature was 60°C at the time of the injection and gradually raised to 250°C at a rate of 3°C/min and finally held at 250°C for 10 min. The relative component concentrations were calculated from the total ion counts. Identification of chemical constituents was based on comparison of the Rt values and mass spectra with those in the NIST/NBS and Wiley libraries.

Chemical Modifications

Fractions 5 were methylated prior to their analysis by GC–MS. Five milligrams of each fraction was dissolved in 2 ml of 5% (v/v) AcOCl in MeOH and kept under continuous stirring at 80°C for 1 h. The reaction mixture was evaporated under vacuum and the residue was partitioned between n-hexane and H₂O. The organic phase was dried over anhydrous Na₂SO₄ and kept in hexane for further GC–MS analysis.

Anti-inflammatory assay

The crude extracts and the fractions were tested for their activity against the phospholipase A₂ (PLA₂). This test allows estimating the anti-inflammatory potential of crude extracts and fractions.

Evaluation of the PLA₂ inhibitory activity was based on a colorimetric assay using red phenol as a pH indicator according to the method of Lobo de Araújo and Radvanyi (1987). Briefly, the assay used bee venom (*Apis mellifera* from Sigma) as the source of enzyme and lecithin (L-α-phosphatidylcholine from Sigma) as the substrate. Compounds were dissolved in DMSO to obtain a concentration of 400 µg/mL. Moreover, 2µL of each sample (crude extract and/or fractions) were incubated in 96-well plates for 1 h at room temperature with 0.02 µg/µL of bee venom PLA₂. The reaction was started by addition of 200 µL of the reaction medium containing 3.5 mM lecithin, 7 mM Triton X-100, 100 mM NaCl, 10 mM CaCl₂ and 0.055 mM red phenol adjusted to an optical density of 1.8 at 550 nm. Absorbances were read at 550 nm on a microplate reader (CERES 900 spectrophotometer). The enzymatic activity, as observed by the liberation of fatty acid, was calculated as the difference in absorbance between the control well and those wells containing the samples at time 0 and 5 min with 30 sec of shaking at room temperature. Reported values are means of two determinations. The anti-inflammatory activity is significant if the PLA₂ inhibitory is higher than 80%.

Results

Anti-inflammatory activity of crude extracts

All results concerning the activity of crude extracts of Sargassaceae species from Solomon Islands are summarized in Table 2.

Only non-polar crude extracts showed a significant activity. Among those active crude extracts, only two showed an activity higher than 95% of inhibition: The ones from *Sargassum aquifolium* from Anuta Paina Island and *Turbinaria conoides* from Lau Lagoon.

The other non-polar crude extracts (*S. aquifolium* from Nggela NW and from Lau Lagoon, *S. cristaefolium*, *T. ornata* and *T. decurrens* from Anuta Paina Island) showed a significant inhibition of the PLA₂, with an activity comprised between 80 and 95%. The non-polar crude extract of *Turbinaria conoides* from Nggela NW did not show activity. In this way, these results showed interspecific and spatial variation of anti-PLA₂ activity of crudes extracts. Based on the respective high anti-inflammatory activity levels, non-polar crude extracts of *Sargassum aquifolium* from Anuta Paina Island and *Turbinaria conoides* from Lau Lagoon were selected for further fractionation.

Anti-inflammatory of fractions

All results concerning the activity of fractions of *Sargassum aquifolium* from Anuta Paina Island and *Turbinaria conoides* from Lau Lagoon are summarized in Table 3.

Concerning *S. aquifolium* from Anuta Paina Island, only the fraction 5 showed a significant and interesting anti-inflammatory activity. No activity was observed for fractions 1, 3 and 4 and fraction 2 presented a non-significant activity (< 80%).

In *T. conoides* from Lau Lagoon, all fractions presented activity except fraction 1. The fractions 2 and 4 presented an activity lower than 95% whereas the activity of fractions 3 and 5 are higher than 95%.

Based on their high respective anti-inflammatory activity, fractions 5 of *S. aquifolium* from Anuta Paina Island and *T. conoides* from Lau Lagoon were selected for chemical analyses.

Chemical analysis of fractions 5

Fraction 5 of *Sargassum aquifolium* from Anuta Paina Island, which showed high activity against PLA₂ (100%), was analyzed by GC–MS and revealed the presence of two saturated fatty acids (palmitic and stearic acid) and one ω-9 monounsaturated fatty acid (Oleic acid) (Table 4).

Fraction 5 of *Turbinaria conoides* from Lau Lagoon, which showed also high activity against PLA₂ (96%) was analyzed by GC–MS and two saturated (palmitic and stearic acid), one ω-9 monounsaturated fatty acids (Oleic acid) and one ω-6 polyunsaturated fatty acid (Linoleic acid) were identified and quantified (Table 4). This last fatty acid also known as 9(Z),12(Z)-Octadecadienoic acid was not observed in the fraction 5 of *Sargassum aquifolium* from Anuta Paina Island (Table 4).

Discussion

Hydromethanolic crude extracts of Sargassaceae species collected in Solomon Islands did not show an anti-inflammatory activity. This is in accordance with reviews of Mayer and Hamann (2002, 2004, 2005) and Mayer *et al.* (2007, 2009) who described that among the 50 new anti-inflammatory compounds described in the literature since 1999, only 3 are polar compounds. Nevertheless, our results disagreed previous experiments from Dar *et al.* (2007) and Kang *et al.* (2008). Indeed, in these works, butanol and methanol crude extracts from *Sargassum wightii*, collected in winter, presented higher anti-inflammatory activity than aspirin and ibuprofen (Dar *et al.* 2007) and ethanol crude extract of *Sargassum thunbergii* presented a similar inhibition than Indomethacin (Kang *et al.* 2008). Some reverse results were nevertheless obtained for others extracts: ethanol and boiling water extracts of *Sargassum fulvellum* and boiling water extract of *Sargassum thunbergii* showed lower anti-inflammatory activities than Indomethacin against edema and erythema of mouse's ear (Kang *et al.* 2008). In higher plants, the hydromethanolic extract of *Carthamus lanatus* L., a biennial plant growing in the Mediterranean area, showed a lower inhibition than Indomethacin: 27,1% against 54,2%, for the extract and the drug respectively (Bocheva *et al.* 2003).

In our study, non-polar crude extracts of Sargassaceae presented interesting significant anti-inflammatory activity. In the literature, some plant and/or seaweed non-polar extracts showed also an anti-inflammatory activity. Indeed, fractions of dichloromethane extract of *Carthamus lanatus* showed significant anti-inflammatory activities in rats (Bocheva *et al.* 2003). The hexanic crude extract of the Brazilian plant *Pterodon emarginatus* Vog. presented some anti-inflammatory activities in rats: inhibition of paw edema induced by carrageenin and/or nystatin, granuloma test and inhibition of migration of neutrophils (Carvalho *et al.* 1999). Moreover, hexane crude extracts from *Sargassum wightii*, collected in winter, presented higher anti-inflammatory activity (inhibition of paw edema in rats) than Aspirin and Ibuprofen and a similar activity than Diclofenac (Dar *et al.* 2007). In *Sargassum fulvellum*, dichloromethane crude extract presented a significant anti-inflammatory activity, higher than those of ethanol and boiling water extracts but little lower than the activity of Indomethacin (Kang *et al.* 2008). In *Sargassum thunbergii*, dichloromethane crude extract showed an anti-inflammatory activity lower than those of ethanol extracts and Indomethacin but higher than the activity of boiling water extract (Kang *et al.* 2008).

Interspecific and temporal variations of the anti-inflammatory activity of crude extracts observed in our study agreed with others studies on the anti-inflammatory activity of crude extracts of *Sargassum* (Kang *et al.* 2008, Dar *et al.* 2007). In our study, spatial variations of anti-inflammatory of Sargassaceae species extracts were observed. In our knowledge, it is the first report on spatial variation of anti-PLA₂ activity from Sargassaceae crude extracts. So, taking into account the anti-inflammatory effect of Sargassaceae species suggested that investigation of marine plants during different seasons and different developmental stages of growth needs to be taken into account during experiments and the interpretation of the results. Additionally, abiotic factors such as climate, soil, time of collection, salinity, temperature, pollution and epiphytic organisms should also be considered as contributing factors as far as levels of the active principles in these seaweeds are concerned.

In our study, the active fractions were a fatty acid mixture. Fatty acids, and especially, ω -3 polyunsaturated fatty acid (ω -3 PUFAs) are well-known as a good anti-inflammatory compounds. Indeed, numerous studies reported the efficiency of ω -3 PUFAs from oily fish and/or oil fish (e.g.: Calder 1998, Calder 2006, Maroon and Bost 2006, Calder 2009b, Calder 2009a), from synthetic ω -3 PUFAs (e.g.: Zhao *et al.* 2005, Weldon *et al.* 2007) and from the green lipped mussel *Perna canaliculus* (Treschow *et al.* 2007).

Nonetheless, no ω -3 PUFA is present in the active fraction from Sargassaceae crude extracts. The main components of *Sargassum aquifolium* active fraction are two saturated fatty acids (palmitic and stearic acid) and one ω -9 monounsaturated fatty acid (oleic acid). Those from *Turbinaria conoides* active fraction are the two same saturated fatty acids (palmitic and stearic acid), the same ω -9 monounsaturated fatty acid (oleic acid) and an ω -6 polyunsaturated fatty acid (linoleic acid).

Our results agreed previous works in effects of fatty acids from sugar cane (*Saccharum officinarum* L.) wax oil in various models of inflammation (Ledón *et al.* 2003, Ledón *et al.* 2005, Ledón *et al.* 2007). Indeed, these authors showed that a mixture of palmitic, oleic, linoleic, and linolenic acids, obtained from sugar cane, had significant *in vivo* and *in vitro* anti-inflammatory activities in rats and mice. Moreover, GC-MS analysis of the dichloromethane extract from *Sargassum fulvellum* revealed the presence of tetradecanoic acid, hexadecanoic acid, neophytadiene, and oleic acid as major constituents (Kang *et al.* 2008). GC-MS analysis of the ethanol extract from *Sargassum thunbergii* revealed the presence of hexadecanoic acid, 8-heptadecene, neophytadiene, and 3,7,11,15-tetramethyl- 2-hexadecen-1-ol as major constituents (Kang *et al.* 2008). Authors resumed that most of constituents in *Sargassum fulvellum* and *Sargassum thunbergii* active extracts are fatty acid-related compounds. Moreover, the anti-inflammatory effects exerted by a fatty acid mixture may be due to its inhibitory effects on arachidonic acid metabolism (Ledón *et al.* 2007).

In conclusion, the present investigation demonstrated that non-polar crude extracts of our Sargassaceae species from Solomon Islands have potent anti-inflammatory activity. In our knowledge, it is the first time that the inhibition of bee venom PLA₂ by non-polar crude extracts and fatty acid mixture from Sargassaceae species is reported. Even if caution should be taken when comparing *in vivo* anti-inflammatory tests and *in vitro* anti-PLA₂ assay, these findings reinforce the claims of the health care industry and indigenous medicine that those seaweeds can be used as remedies for inflammation related symptoms.

However, further studies will be needed (1) to elucidate the mechanism(s) involved in the anti-PLA₂ effect of the fatty acids mixture from Sargassaceae species and (2) to confirm the anti-inflammatory activity of this fatty acids mixture by other *in vitro* and *in vivo* tests.

Acknowledgements

This study is part of the Ph.D. project carried out by the first author at IUEM (UBO), within the Laboratory of Ecophysiology and Biotechnology of Halophytes and Marine algae (LEBHAM), in collaboration with the research team MDCEM « Molécules de défense et de communication dans les écosystèmes microbiens » of the laboratory MCAM « Molécules de Communication et Adaptation des Micro-organismes » FRE 3206 CNRS/MNHN. This research was supported in part by a Coral Reef Initiative for South Pacific (CRISP) Programme and by the French Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MENESR). The authors sincerely thank M.P. Friocourt for fruitful help in the English writing of this manuscript. Additional thanks are addressed to the sixth author, Pr. Claude Payri and colleagues from IRD Nouméa (New Caledonia), for the collection and conditioning of the seaweed samples.

References : Voir la partie Bibliographie en page 301

Tables captions:

Table 1: Sampling areas with dates of sampling and name of species collected in Solomon Islands

Table 2: Anti-inflammatory evaluations of crude extracts from Sargassaceae species collected in Solomon Islands. The grey color indicates the selection of the fraction for further investigations

Table 3: Anti-inflammatory evaluations of fractions of *Sargassum aquifolium* from Anuta Paina Island and *Turbinaria conoides* from Lau Lagoon (Solomon Islands). Fractions 1-5 are obtained as presented on Figure 1. The grey color indicates the selection of the fraction for further chemical analysis

Table 4 : Composition of fraction 5 of *Sargassum aquifolium* from Anuta Paina Island and *Turbinaria conoides* from Lau Lagoon (Solomon Islands) analysed by GC-MS

Figure caption:

Figure 1 : Purification process of the non-polar Sargassaceae extracts showing an anti-inflammatory activity, examples for *Turbinaria conoides* (A) and *Sargassum aquifolium* (B).

Table 1: Sampling areas with dates of sampling and name of species collected in Solomon Islands

Sampling areas	Sampling date	Species
SOLOMON ISLANDS	Malaita island, Anuta Paina	<i>Sargassum aquifolium</i>
		<i>Sargassum cristaefolium</i>
		<i>Turbinaria ornata</i>
		<i>Turbinaria decurrens</i>
	Malaita island, Lau Lagoon	<i>Turbinaria decurrens</i>
		<i>Sargassum aquifolium</i>
	17/07/04	<i>Turbinaria conoides</i>
	Nggela island, NW	<i>Turbinaria conoides</i>
		<i>Sargassum aquifolium</i>

Table 2: Anti-inflammatory evaluations of crude extracts from Sargassaceae species collected in Solomon Islands. The grey color indicates the selection of the fraction for further investigations

Species	Site	% inhibition PLA ₂ (400 µg/mL)	
		polar extract	non-polar extract
<i>Sargassum aquifolium</i>	Anuta Paina Island	No activity	96
<i>Sargassum aquifolium</i>	Nggela NW	No activity	81
<i>Sargassum. aquifolium</i>	Lau Lagoon	No activity	89
<i>Sargassum cristaefolium</i>	Anuta Paina Island	No activity	93
<i>Turbinaria ornata</i>	Anuta Paina Island	No activity	88
<i>Turbinaria decurrens</i>	Anuta Paina Island	No activity	93
<i>Turbinaria conoides</i>	Lau Lagoon	No activity	97
<i>Turbinaria conoides</i>	Nggela NW	No activity	No activity

Table 3: Anti-inflammatory evaluations of fractions of *Sargassum aquifolium* from Anuta Paina Island and *Turbinaria conoides* from Lau Lagoon (Solomon Islands). Fractions 1-5 are obtained as presented on Figure 1. The grey color indicates the selection of the fraction for further chemical analysis

Fractions	% inhibition PLA ₂ (400 µg/mL)	
	<i>Sargassum aquifolium</i> (Anuta Paina Island)	<i>Turbinaria conoides</i> (Lau Lagoon)
1	No activity	1
2	67	82
3	No activity	95
4	No activity	94
5	100	96

Table 4: Composition of fraction 5 of *Sargassum aquifolium* from Anuta Paina Island and *Turbinaria conoides* from Lau Lagoon (Solomon Islands) analysed by GC-MS

Fatty acids	Chemical composition of fraction 5	
	<i>Sargassum aquifolium</i> (Anuta Paina Island)	<i>Turbinaria conoides</i> (Lau Lagoon)
Hexadecanoic acid (Palmitate)	29.7%	25.1 %
9(Z)-Octadecenoic Acid (Oleate)	30.5 %	34.9 %
Octadecanoic Acid (Stearate)	15.4 %	9.3 %
9(Z),12(Z)-Octadecadienoic (Linoleate)	Acid Absent	11.0 %

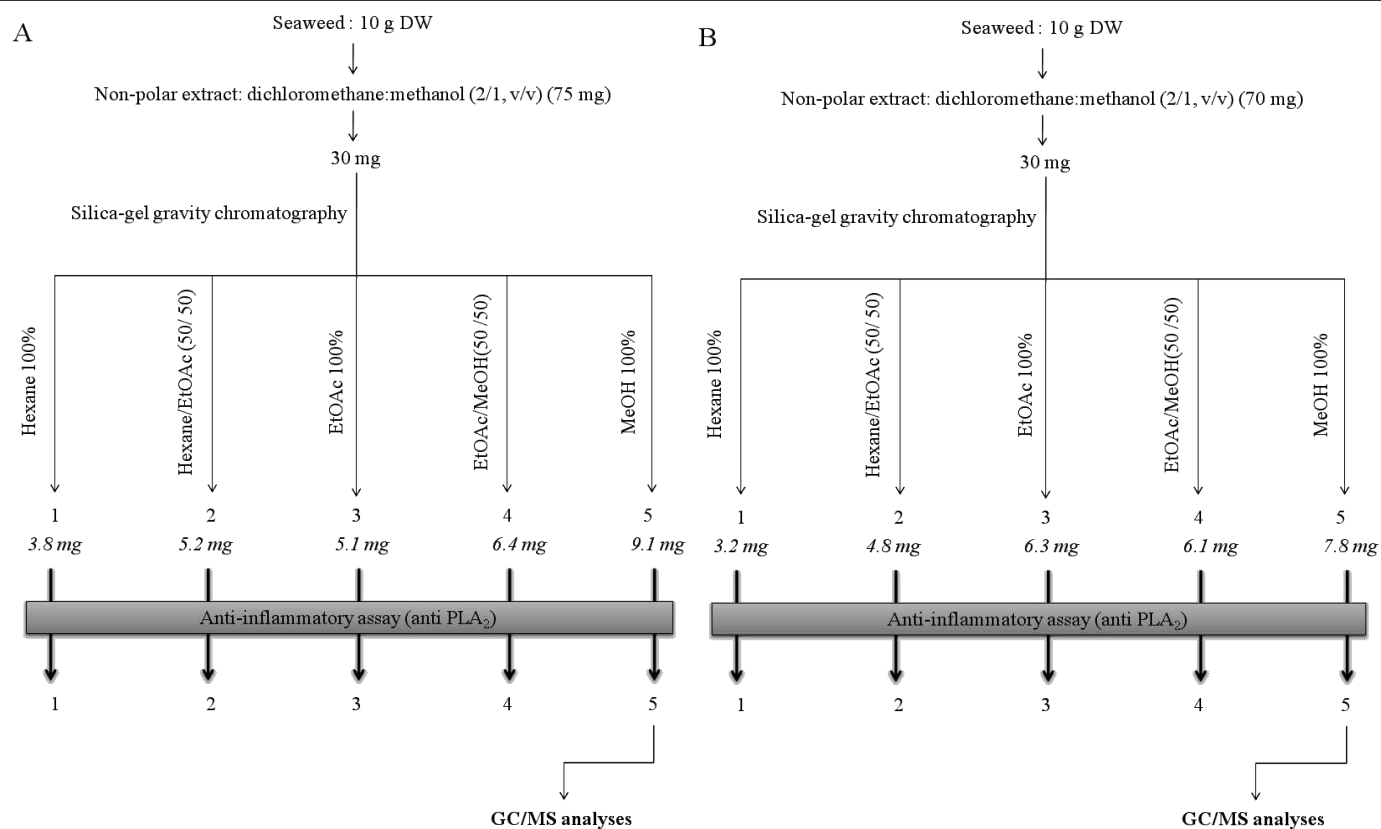


Figure 1: Purification process of the non-polar Sargassaceae extracts showing an anti-inflammatory activity, examples for *Turbinaria conoides* (A) and *Sargassum aquifolium* (B).

2.3.2. Isolement de composé(s) à activité antiradicalaire

Les fractions obtenues par flash chromatographie à partir des extraits bruts apolaires de *Bifurcaria bifurcata* de la Pointe du Diable et de Porsmeur et présentant en CCM des spots identiques pour une même espèce ont été regroupées (accolades sur la Figure 87). Finalement, entre 22 à 24 fractions ont ainsi été obtenues.

2.3.2.1. Test DPPH sur les fractions de *Bifurcaria bifurcata* de la Pointe du Diable et de Porsmeur

Les fractions obtenues via le fractionnement de l'extrait apolaire de *Bifurcaria bifurcata* de la Pointe du Diable par flash chromatographie sur cartouche de C18 présentent une activité antiradicalaire supérieure (entre 15 et 1,13 fois supérieur, EC50 entre $0,11 \pm 0,006$ mg/mL et $1,49 \pm 0,07$ mg/mL) à l'activité montrée par l'extrait brut (EC50 = $1,67 \pm 0,08$ mg/mL).

La fraction 3 présente une activité proche de celle de l'antioxydant de synthèse utilisé comme témoin positif : le BHA (avec respectivement pour la fraction 3 et le BHA, EC50 = $0,11 \pm 0,006$ mg/mL et EC50 = $0,10 \pm 0,005$ mg/mL). Deux autres fractions issues de l'extrait brut de *B. bifurcata* récoltée à la Pointe du Diable montrent une forte activité antiradicalaire. Il s'agit de la fraction 5 (EC50 = $0,17 \pm 0,01$ mg/mL) et de la fraction 11 (EC50 = $0,17 \pm 0,02$ mg/mL) (Figure 88).

L'activité antiradicalaire des autres fractions obtenues de l'extrait apolaire de *B. bifurcata* de la Pointe du Diable varie entre $1,49 \pm 0,07$ mg/mL et $0,27 \pm 0,08$ mg/mL. Cette activité antiradicalaire est fonction de la fraction considérée (Figure 88).

Les fractions obtenues via le fractionnement de l'extrait apolaire de *B. bifurcata* de Porsmeur par flash chromatographie sur cartouche de C18 ne présentent pas toutes une activité antiradicalaire supérieure à celle présentée par l'extrait brut. En effet, la fraction 13 et la fraction 20 sont moins actives que l'extrait brut (avec respectivement EC50 = $1,58 \pm 0,1$ mg/mL, EC50 = $1,90 \pm 0,3$ mg/mL et EC50 = $1,45 \pm 0,8$ mg/mL pour les fractions 13 et 20 et l'extrait brut) (Figure 88).

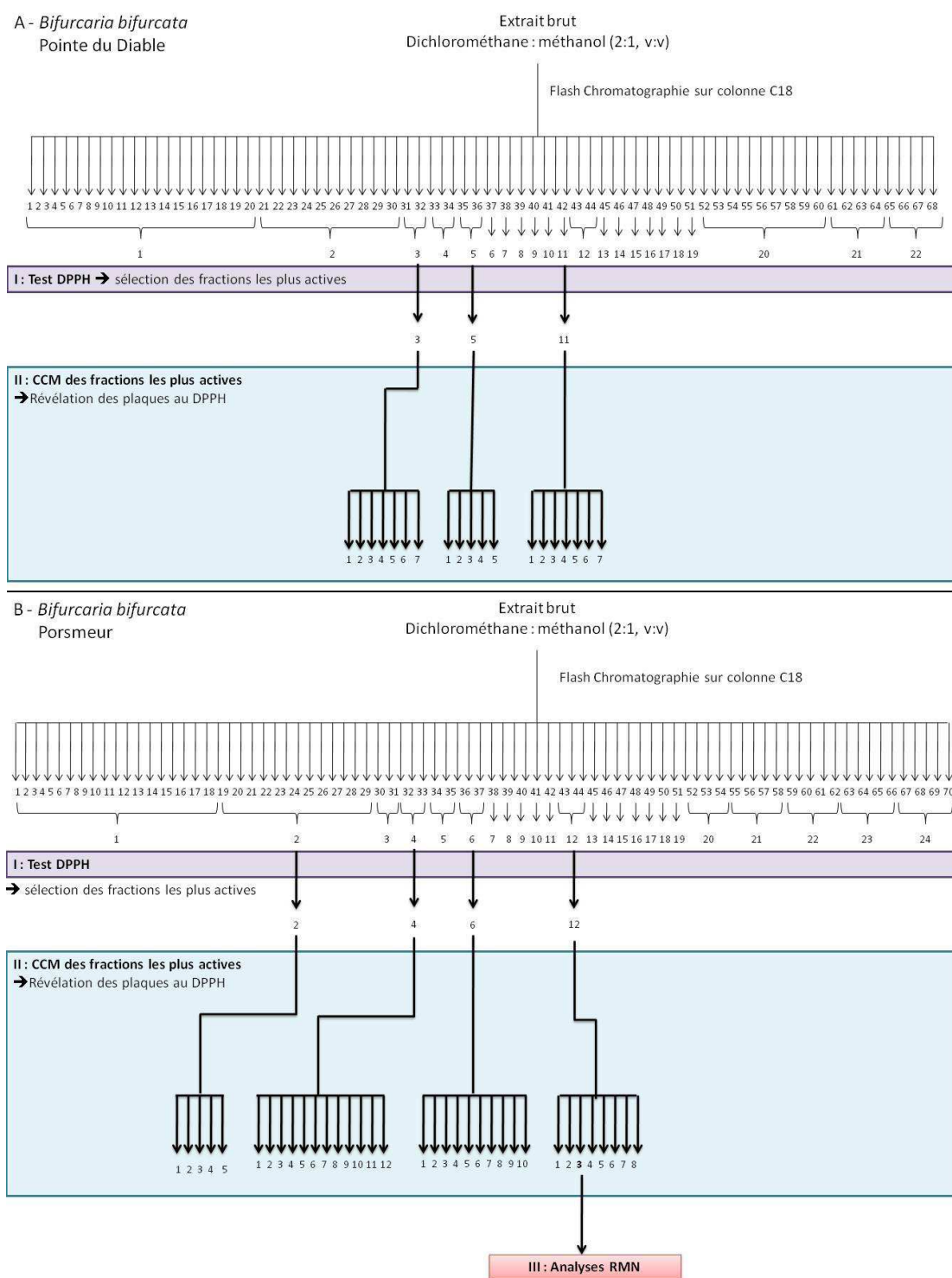


Figure 87 : Schéma synthétique des travaux de purification entrepris sur les extraits apolaires de *Bifurcaria bifurcata* en provenance de la Pointe du Diabie (A) et de Porsmeur (B) et présentant une activité anti-radicalaire

Néanmoins, 4 fractions présentent des activités antiradicalaires proches de celle de l'antioxydant de synthèse utilisé comme témoin positif (le BHA). Il s'agit des fractions 2, 4, 6 et 12. Ces fractions présentent des EC50 de $0,11 \pm 0,007$ mg/mL, $0,12 \pm 0,007$ mg/mL, $0,18 \pm 0,002$ mg/mL et $0,16 \pm 0,01$ mg/mL. Le BHA montre un EC50 de $0,10 \pm 0,005$ mg/mL (Figure 88). L'activité antiradicalaire des autres fractions isolées de l'extrait apolaire de *Bifurcaria bifurcata* de Porsmeur varient entre $1,30 \pm 0,3$ mg/mL et $0,20 \pm 0,06$ mg/mL. Cette activité antiradicalaire est fonction de la fraction considérée (Figure 88). Les fractions 3, 5, 11 de *B. bifurcata* de la Pointe du Diable (nommées PD-F3, PD-F5 et PD-F11) et les fractions 2, 4, 6 et 12 de *B. bifurcata* de Porsmeur (nommées PM-F2, PM-F4, PM-F6 et PM-F12) ont été sélectionnées pour des analyses complémentaires en CCM.

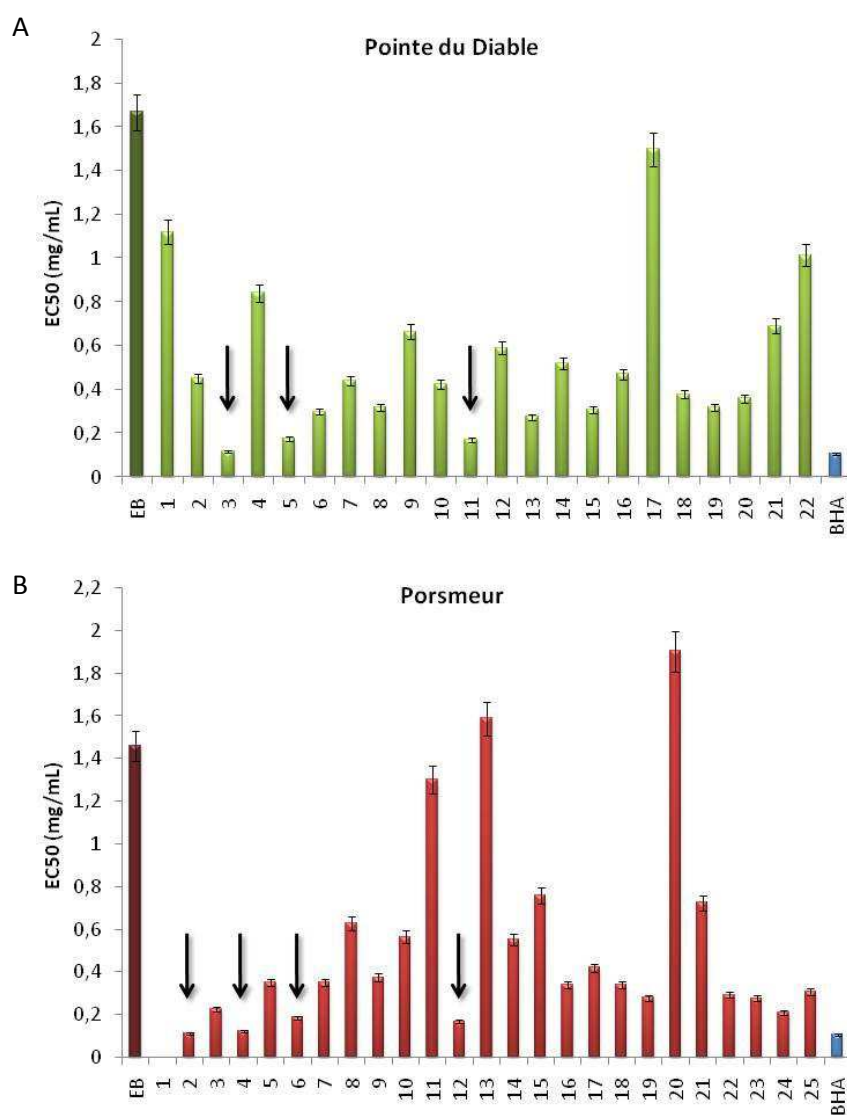


Figure 88 : Activité antiradicalaire des extraits bruts apolaires de *Bifurcaria bifurcata* de la Pointe du Diable (A) et de Porsmeur (B) et des fractions obtenues via le fractionnement de ces extraits par flash chromatographie sur cartouche de C18. Le BHA a été utilisé comme témoin positif. Les flèches indiquent les fractions les plus actives retenues pour analyse complémentaire en CCM. EB : Extrait brut.

2.3.2.2. Analyses complémentaires en CCM des fractions sélectionnées

L'analyse en CCM des fractions sélectionnées au paragraphe précédent, a révélé la présence de nombreux composés antiradicaux lors de la révélation au DPPH, visualisables par la présence d'un halo blanc autour des spots. Parmi ces composés, la fucoxanthine est retrouvée au sein des fractions PD-F11 et PM-F6 ($R_f = 0,3$, Figure 89). Cette fucoxanthine présente une activité antiradicalaire (halo blanchâtre autour des spots).

La fraction PM-F2 ne montre qu'un seul composé ayant migré et ce composé n'est apparemment pas antiradicalaire. Par contre, la majorité du dépôt, qui n'a pas migré, inhibe le DPPH pulvérisé sur la plaque (halo blanchâtre autour du dépôt) (Figure 89).

La fraction PM-F12 montre un certain nombre de spots actifs. Le spot intitulé PM-F12-3 et signalé par une flèche sur la Figure 89, a été sélectionné du fait de sa taille, de son activité et de sa spécificité au site de Porsmeur. Son R_f est de 0,58. Ce spot PM-F12-3 a été ensuite analysé en RMN afin d'identifier les molécules qui le composent.

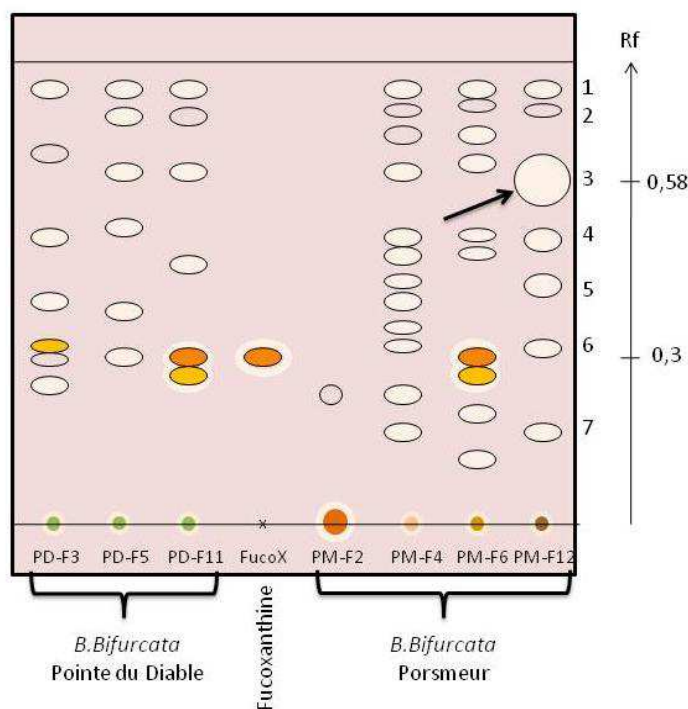


Figure 89 : Schéma de la plaque CCM après migration et révélation au DPPH. La flèche indique le spot sélectionné pour des analyses structurales en RMN (spot F12-3).

2.3.2.3. Analyse du spot «PM- F12-3 » par RMN

L'analyse par RMN ^1H et ^{13}C de la fraction PM-F12-3 a permis l'obtention de spectres annotés et présentés en Figures 91 et 92.

La fraction PM-F12-3 a été analysée en RMN du proton et du carbone. L'analyse des spectres RMN ^1H (Figure 90) et RMN ^{13}C (Figure 91) ainsi que la confrontation des signaux obtenus avec la littérature ont permis d'identifier le composé majoritaire de la fraction PM-F12-3 comme étant de l'éléganolone (voir Figures 91 et 92 pour la formule chimique de l'éléganolone). L'attribution des signaux caractéristiques de l'éléganolone sont présentés sur chacun des spectres (Figures 91 et 92) ainsi qu'en annexe IV-2.

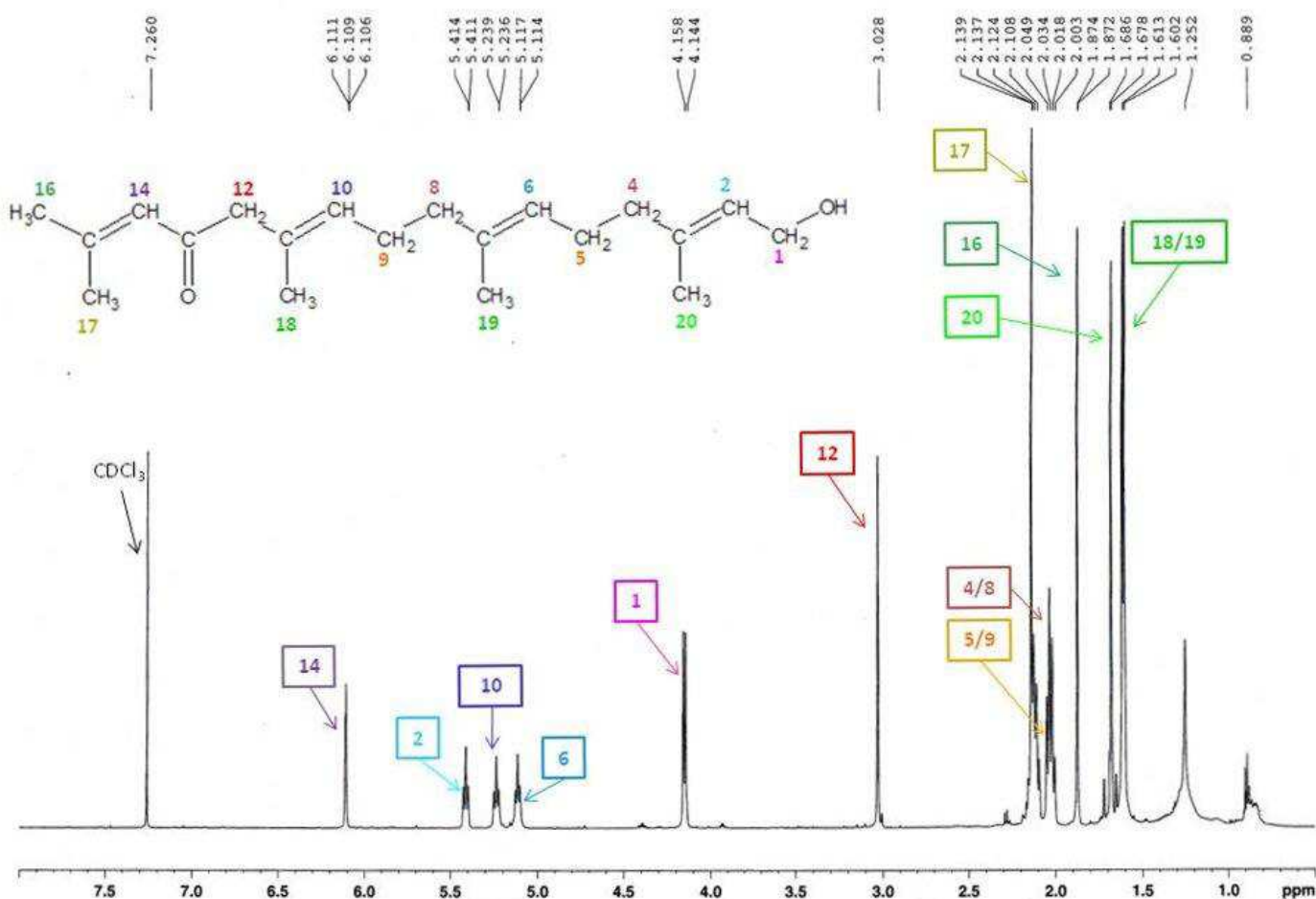


Figure 90 : Spectre RMN ^1H (Bruker, 500 MHz) de la fraction PM-F12-3 de l'extrait dichlorométhane:méthanol (2:1, v:v) de *Bifurcaria bifurcata*. Les attributions des pics caractéristiques de l'éléganolone sont représentés (d'après Culioli *et al.* 1999a).

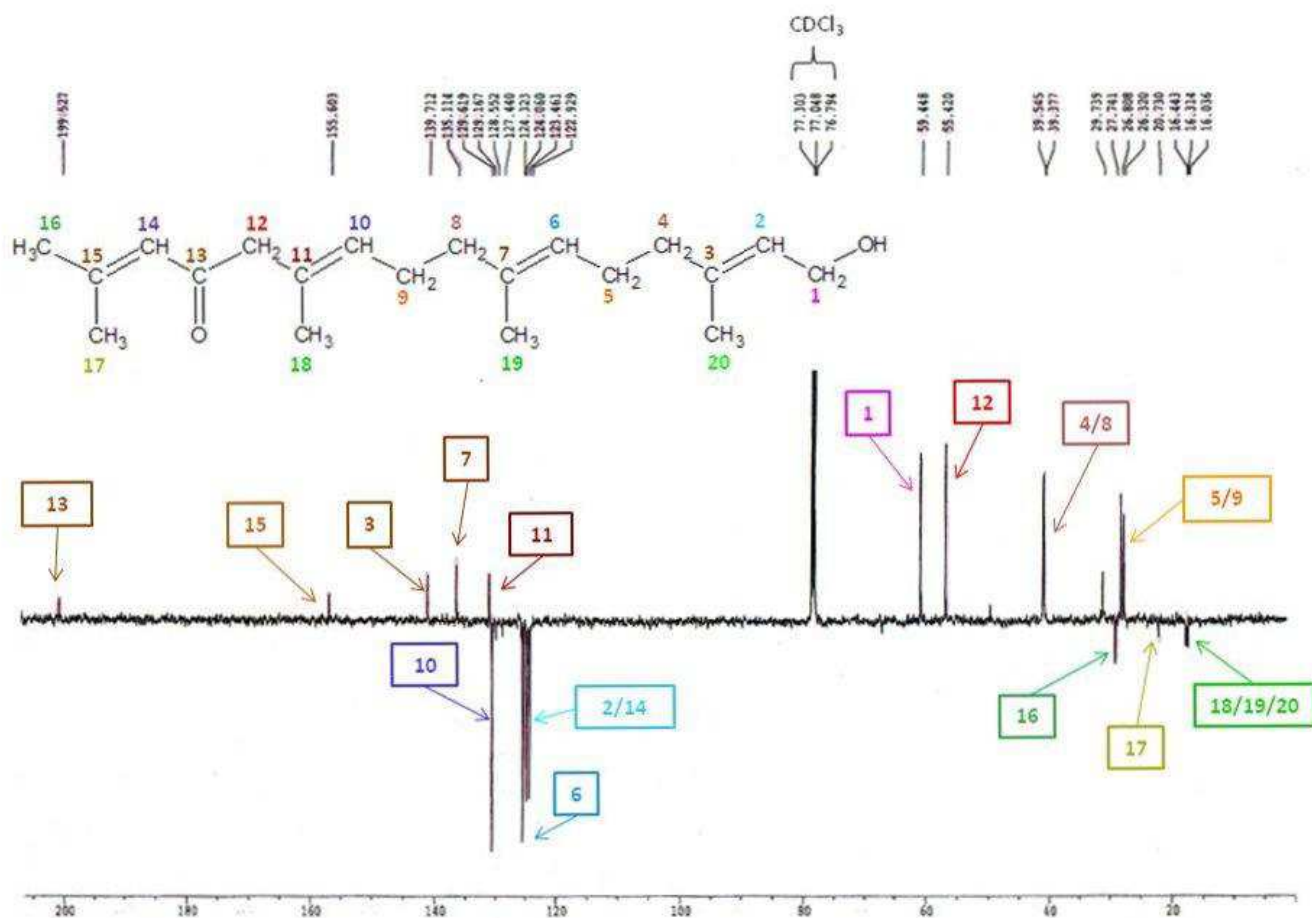


Figure 91 : Spectre RMN ¹³C (Bruker, 125 MHz) de la fraction PM-F12-3 de l'extrait dichlorométhane:méthanol (2:1 , v:v) de *Bifurcaria bifurcata*. Les attributions des pics caractéristiques de l'éléganolone sont représentés (d'après Culioli *et al.* 1999a).

2.3.2.4. Rendement du fractionnement par bioguidage de l'extrait apolaire de *Bifurcaria bifurcata*

La Figure 92 reprend les principales étapes du bioguidage ayant abouti à la purification et à l'identification de l'éléganolone dans la fraction PM-F12-3. Ainsi, 9 mg de la fraction PM-F12-3 ont été récupérés à partir de 14,13 mg de la fraction PM-F12. Or 141,3 mg de la fraction PM-F12 avait pu être récupérés après le fractionnement de 1g d'extrait brut apolaire. Le rendement de la purification de l'éléganolone est donc de 0,9 % environ. Le rendement de l'extraction au dichlorométhane:méthanol (2:2 , v:v) étant de 20% pour *Bifurcaria bifurcata*, la teneur de l'éléganolone au sein de *B. bifurcata* récoltée à Porsmeur en avril 2008 est de 1,8 mg/g de matière sèche.

B - *Bifurcaria bifurcata*
Porsmeur (Avril 2008)

Extrait brut : Dichlorométhane : méthanol (2:1, v:v)
1g (obtenu à partir de 5 g de MS)

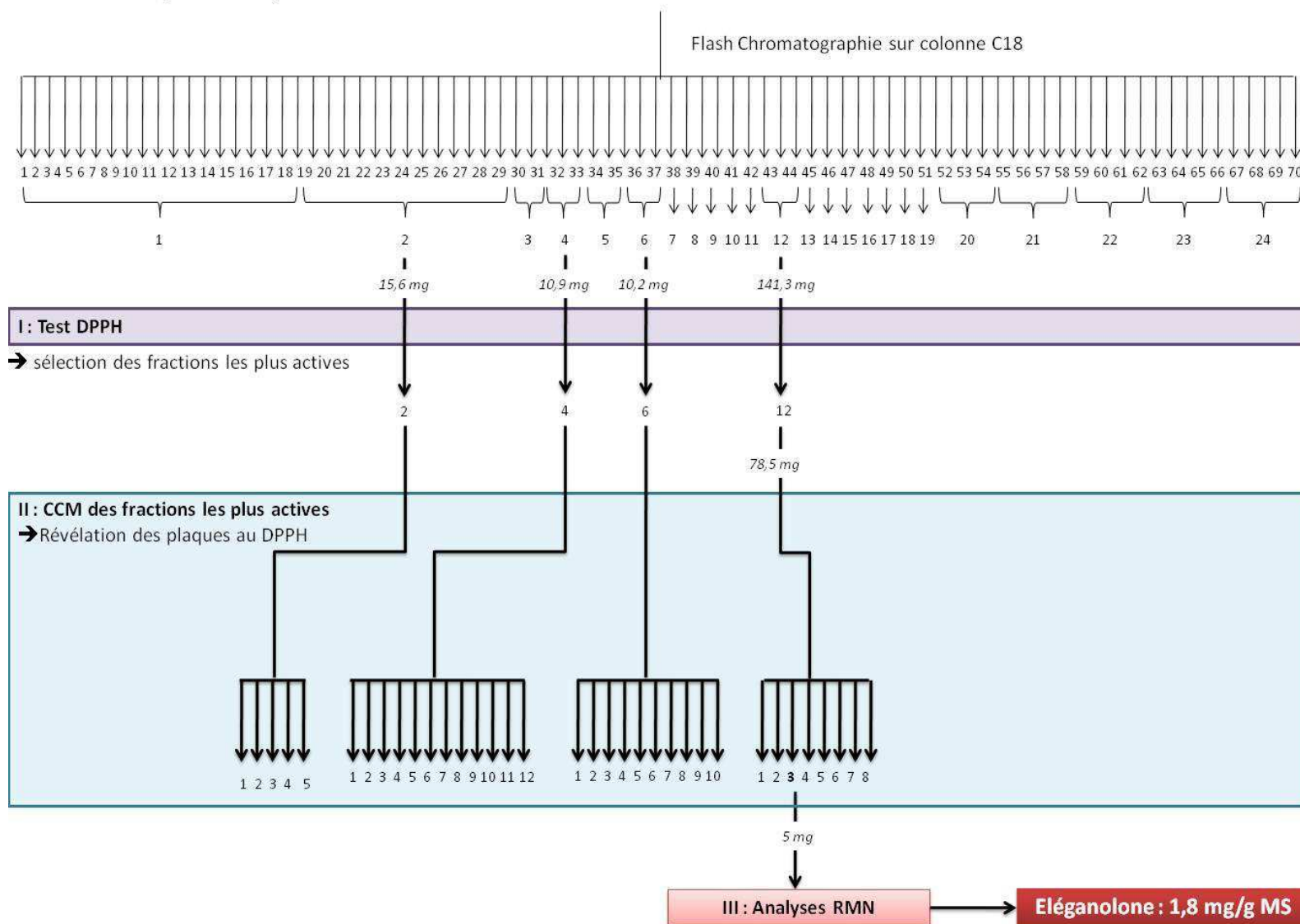


Figure 92 : Fractionnement par bioguidage de l'extrait apolaire de *Bifurcaria bifurcata* (récolté à Porsmeur en avril 2008) ayant abouti à l'identification de l'éléganolone, composé antiradicalaire. MS : matière sèche algale.

2.4.Purification de la fucoxanthine

La dernière étape de purification de la fucoxanthine nous a permis de récolter le spot orange ayant migré jusqu'à un R_f de 0,3 (Figure 93).

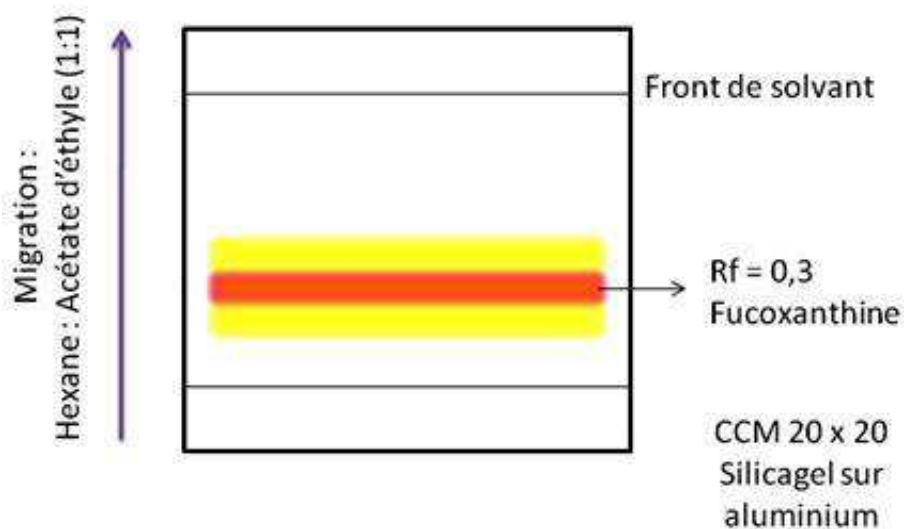


Figure 93 : Chromatogramme illustrant les résultats de la dernière étape de la purification de la fucoxanthine

Les analyses des spectres RMN (^1H , ^{13}C , COSY, HMBC et HMQC), ainsi que la confrontation des données obtenues avec la littérature, nous ont permis d'assigner les différentes parties du spectre et ainsi identifier la fucoxanthine (Figure 94 et

Tableau 21).

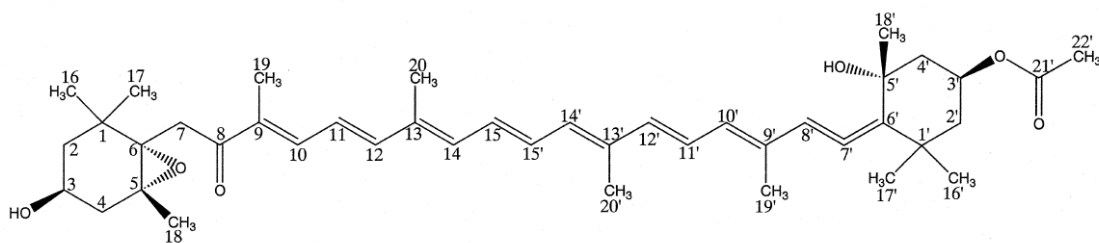


Figure 94 : Structure chimique de la fucoxanthine (all *trans*-fucoxanthine) (d'après Yan *et al.* 1999).

In fine, 8,5 mg de fucoxanthine ont pu être récupérés à partir de 1,4 g d'extrait sec via le protocole de purification détaillé à la Figure 85. Au départ, 6,4g d'extrait sec ont été obtenus à partir de 39 g de matière sèche, le rendement de la purification est donc à peu près de 0,1%. **La teneur de la fucoxanthine au sein de *Sargassum muticum* récoltée à la Pointe du Diable en Avril 2008 est de 0,99 mg/g de matière sèche.**

Tableau 21 : Données des spectres RMN du proton (^1H -RMN) et du carbone (^{13}C -RMN) et attributions des signaux (d'après Haugan *et al.* 1992, Yan *et al.* 1999).

C	400 MHz	125 MHz	Assignement	C	400 MHz	125 MHz	Assignement
1	-	34,18	C	1'	-	34,19	C
2	1,51 /1,35	47,12	CH ₂	2'	1,41 /2,02	45,47	CH ₂
3	3,81	64,37	CH	3'	5,38	68,01	CH
4	1,78 /2,33	41,71	CH ₂	4'	1,53 /2,29	45,27	CH ₂
5	-	69,01	C	5'	-	72,72	C
6	-	65,95	C	6'	-	117,00	C
7	2,61 /3,48	40,85	CH ₂	7'	-	201,51	C
8	-	198,00	C	8'	6,05	103,42	CH
9	-	134,59	C	9'	-	133,00	C
10	7,15	139,08	CH	10'	6,14	128,57	CH
11	6,57	123,41	CH	11'	6,60	125,71	CH
12	6,68	145,03	CH	12'	6,39	136,64	CH
13	-	136,65	C	13'	-	137,14	C
14	6,42	134,15	CH	14'	6,28	132,20	CH
15	6,55	129,46	CH	15'	6,77	132,51	CH
16	0,96	28,17	CH ₃	16'	1,07	29,23	CH ₃
17	1,03	31,31	CH ₃	17'	1,38	25,02	CH ₃
18	1,22	21,19	CH ₃	18'	-	32,11	CH ₃
19	1,94	12,02	CH ₃	19'	1,81	13,04	CH ₃
20	1,99	13,05	CH ₃	20'	1,99	12,03	CH ₃
				21'	-	170,50	C
				22'	2,03	21,20	CH ₃

2.5. Tests d'activités biologiques des molécules isolées

Le Tableau 22 résume tous les résultats obtenus lors des tests d'activité pour la fucoxanthine, l'éléganolone, les fractions B-BbPM, To-CCM-3 et Tc-CCM-3.

Tableau 22 : Résultats des tests d'activité concernant les molécules isolées chez les différentes espèces étudiées.

Molécules ou fractions isolées	Tests biologiques				
	Antiradicalaire	Antioxydant	Neuro-toxique	Cytotoxique	Anti-inflammatoire
Fucoxanthine	Oui	Oui	Non	Non	Non
Eleganolone (PM-F12-3)	Oui	Oui	Non	Non	Non
Fraction B-BbPM (contient de la bifurcanone)	Non	Non	Non	Non	Non
Fraction To-CCM-3 (pool d'acides gras)	Non	Non	Non	Non	Non 43% inhibition
Fraction Tc-CCM-3 (contient de l'acide turbinarique)	Non	Non	Non	Non	Non 63% inhibition

La fucoxanthine purifiée de *Sargassum muticum* et l'éléganolone purifiée de *Bifurcaria bifurcata* ne présentent aucune activité neurotoxique, cytotoxique et anti-inflammatoire. Par contre, ces deux molécules présentent des activités antioxydante et antiradicalaire similaires, mais inférieures, aux activités des antioxydants de synthèse (Figure 95). En effet, en ce qui concerne l'activité antiradicalaire, testée par la méthode du DPPH sur microplaque, les antioxydants de synthèse montrent des EC50 compris entre $0,10 \pm 0,008$ mg/mL et $0,26 \pm 0,03$ mg/mL alors que les EC50 de la fucoxanthine et de l'éléganolone sont de $0,72 \pm 0,04$ et $0,71 \pm 0,03$ mg/mL respectivement (Figure 95).

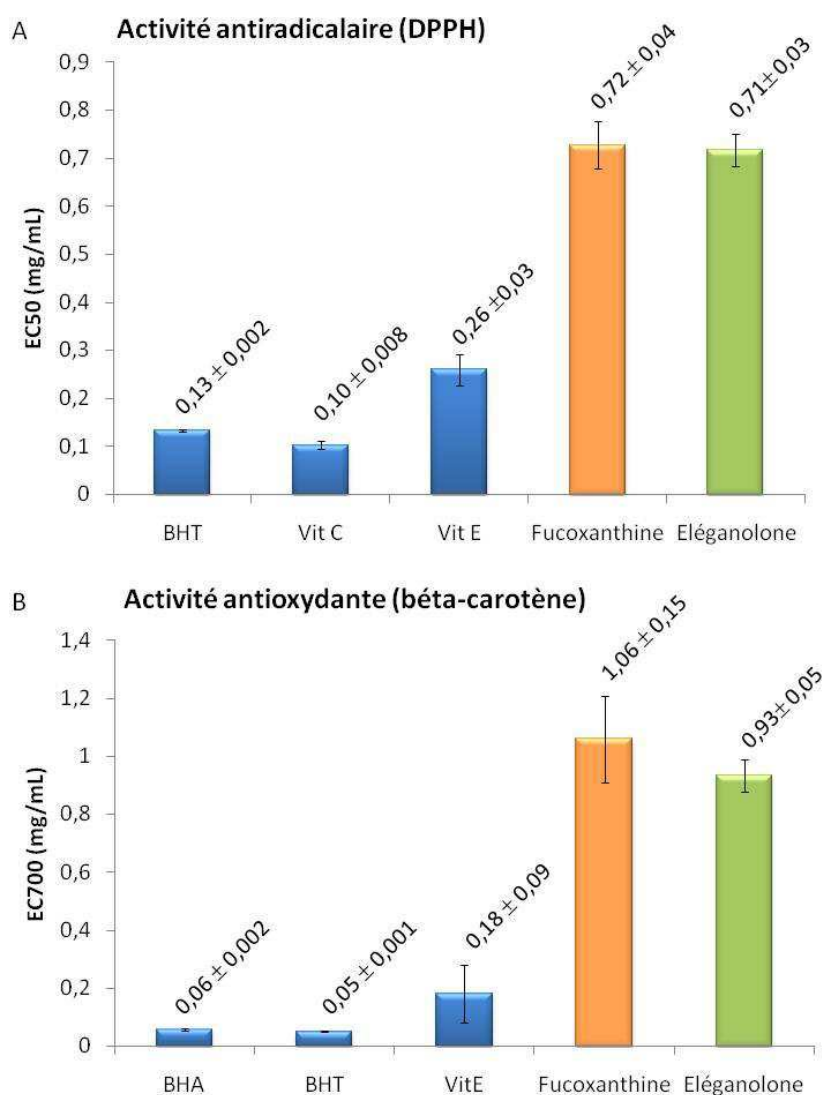


Figure 95 : Activités antiradicalaire (A) et antioxydante (B) de la fucoxanthine, de l'éléganolone et des antioxydants de synthèse (BHA, BHT, Vit C et Vit E)

De même, en ce qui concerne l'activité antioxydante testée via la méthode du blanchiment du β -carotène, les antioxydants de synthèse montrent des EC700 compris entre $0,05 \pm 0,002$ mg/mL et $0,18 \pm 0,09$ mg/mL alors que les EC50 de la fucoxanthine et de l'éléganolone sont de $1,06 \pm 0,15$ et $0,93 \pm 0,05$ mg/mL respectivement. Aucune des fractions isolées au Chapitre précédent, à savoir les fractions B-BbPM, Tc-CCM-3 et To-CCM-3, ne montre d'activité biologique.

A noter que la fraction Tc-CCM-3 contenant de l'acide turbinarique présente une activité anti-inflammatoire supérieure à la fraction To-CCM-3, ne contenant pas d'acide turbinarique : 63% contre 43% d'inhibition de la PLA₂. Cependant, cette activité étant inférieure à 80% d'inhibition de la PLA₂, elle est considérée comme non-significative.

3. Discussion

3.1. Criblage d'activités biologiques

A notre connaissance, cette étude est la première rapportant des activités cytotoxiques, neurotoxiques et anti-PLA₂ d'extraits bruts provenant d'espèces de Sargassaceae tempérées et tropicales. Une étude antérieure avait déjà été menée sur des composés issus de macroalgues marines et inhibant la phospholipase A₂ du venin d'abeille, mais aucune espèce de Sargassaceae n'y est recensée (Mayer *et al.* 1993).

Les résultats du criblage d'activités biologiques (activité neurotoxique, cytotoxique et anti-inflammatoire) montrent que les **extraits au dichlorométhane:méthanol** (2:1 , v:v) sont les plus actifs et qu'ils le sont, essentiellement, envers la phospholipase A₂. Cette tendance est valable aussi bien pour les algues tempérées que pour les algues tropicales. Il n'est pas aisé de comparer ces résultats avec ceux de la littérature. En effet, comme le montre le Tableau 23, les méthodes utilisées pour faire ces tests biologiques sont variées, de même que les protocoles d'extraction. Néanmoins, deux études récentes rapportent l'existence d'extraits anti-inflammatoires pour des espèces du genre *Sargassum* (Dar *et al.* 2007, Kang *et al.* 2008). Cependant, ces travaux ont été effectués sur des tests *in vivo* alors que notre étude ne s'est portée que sur un test anti-inflammatoire *in vitro*.

Le manque d'activité des extraits polaires n'est pas surprenant. En effet, d'après Mayer et collaborateurs (Mayer et Hamann 2002, Mayer et Hamann 2004, Mayer et Hamann 2005, Mayer *et al.* 2007, Mayer *et al.* 2009), sur 50 nouveaux composés anti-inflammatoires décrits et publiés depuis 1999, seulement 3 sont des composés polaires.

Dans la littérature, l'activité cytotoxique est la plus souvent testée chez les algues (Ioannou et Roussis 2009). Néanmoins, comme le montre le Tableau 23, seules cinq espèces de Sargassaceae présentent des extraits cytotoxiques et parmi ces cinq espèces, trois présentent des extraits actifs contre des lignées de cellules tumorales (Numata *et al.* 1991, Zubia *et al.* 2009). L'extrait dichlorométhane:méthanol (1:1 , v:v) de *Bifurcaria bifurcata*, récoltée à l'anse de Melon en septembre 2007 présente une forte activité anti-tumorale (Zubia *et al.* 2009). Dans notre étude, les extraits de *Bifurcaria bifurcata* ne sont pas actifs contre les cellules KB du carcinome du larynx. Cette différence d'activité s'explique par la différence de solvant utilisé pour l'extraction, la nature des lignées cellulaires utilisées mais aussi la période de récolte de l'algue et le site de prélèvement.

Tableau 23 : Liste non exhaustive d'extraits de macroalgues présentant des activités anti-inflammatoire, cytotoxique et neurotoxique. Les espèces de Sargassaceae sont indiquées en gras.

Activité	Source (espèces)	Extraits	Test(s) effectué(s)	Références
Anti-inflammatoire	<i>Turbinaria ornata</i>	Eau chaude (90-95°C)	Œdème des pattes induit par la carrageenine (rat) & Perméabilité vasculaire (souris)	Ananthi <i>et al.</i> In Press
	<i>Ulva conglobata</i>	Méthanol	Inhibition de la cyclooxygénase & Inhibition des interférons gamma	Jin <i>et al.</i> 2006
	<i>Chlorella stigmatophora</i> & <i>Phaeodactylum triconutum</i>	Eau, Méthanol	Œdème des pattes induit par la carrageenine (Rats)	Guzman <i>et al.</i> 2001
	<i>Sargassum wightii</i>	Hexane, Méthanol, Butanol	Œdème des pattes induit par la carrageenine (Rats)	Dar <i>et al.</i> 2007
	<i>Sargassum fulvellum</i> et <i>S. thunbergii</i>	Dichlorométhane, Eau bouillante	Œdème de l'oreille induit par du Phorbol 12-myristate 13-acétate (Souris)	Kang <i>et al.</i> 2008
	<i>Corallina elongata</i> , <i>Galaxaura oblongata</i> , <i>Laurencia obtusa</i> , <i>Udotea petiolata</i> , <i>Cladophora</i> sp., <i>Codium</i> sp., <i>Hypnea</i> sp.	Chloroforme, Méthanol	Oedème de l'oreille induit par du TPA (Souris) & Œdème des pattes induit par la carrageenine (Souris)	Paya <i>et al.</i> 1993
cytotoxicité	<i>Stoechospermum marginatum</i> , <i>Sargassum swartzii</i> , <i>S. binderi</i> , <i>Spatoglossum asperum</i> , <i>Stokeyia indica</i> <i>Caulerpa racemosa</i>	Ethanol	Test sur <i>Artemia salina</i>	Ara <i>et al.</i> 1999
	<i>Cystoseira tamariscifolia</i>	Hexane, Ethyl ether, Dichlorométhane	Test sur <i>Artemia salina</i>	Abourriche <i>et al.</i> 1999
	<i>Sargassum tortile</i>	Méthanol	Leucémie lymphocytaire P-388	Numata <i>et al.</i> 1991
	<i>Plocamium telfairiae</i>	Méthanol	Cellules HT29 du carcinoma du colon	Kim <i>et al.</i> 2007
	<i>Leathesia difformis</i> , <i>Polysiphonia urcedata</i> , <i>Scytosiphon lomentarius</i> , <i>Gloiopeltis furcata</i> , <i>Punctaria latifolia</i> , <i>Symphyocladia latiuscula</i> , <i>Rhomela confervoides</i> et <i>Ulva pertusa</i>	Méthanol	Cellules KB du carcinome de la peau & Cellules HT 29 du carcinome du colon	Xu <i>et al.</i> 2004
	<i>Amphiroa zonata</i>	Méthanol	Cellules leucémiques L1210, HL60 et MOLT-4	Harada et Kamei 1997
	47 espèces d'algues	Méthanol	Cellules leucémiques L1210	Harada <i>et al.</i> 1997
	<i>Bifurcaria bifurcata</i> , <i>Cystoseira tamariscifolia</i> , <i>Desmarestia ligulata</i> , <i>Dictyota dichotoma</i> et <i>Halydris siliquosa</i>	Dichlorométhane Méthanol (1:1,v:v)	Cellules lymphomiques Daudi Cellules leucémiques Jurkat et K562	Zubia <i>et al.</i> 2009
Neuro-toxicité	<i>Galaxaura marginata</i>	Ethanol: Acetic Acid (5:1 v:v)	Injections directes (Souris)	Rozas et Freitas 2008
	<i>Ulva conglobata</i>	Méthanol	Neurotoxicité induite par le glutamate (cellules HT22)	Jin <i>et al.</i> 2006

Cependant, plusieurs composés montrant une activité cytotoxique ont été identifiés chez des espèces de Sargassaceae. C'est le cas du Mediterraneol A, de la Mediterraneone et du Cystoseirol isolés de *Cystoseira mediterranea*, de la Usneoidone E, composé présent chez *Cystoseira usneoides*, de l'Hydroxysargaquinone, du Sargasal I et du Sargasal II identifiés et isolés de *Sargassum tortile*, d'un fucostérol oxygéné et d'hydroperoxy-sterols retrouvés chez *Turbinaria conoides* et enfin de l'acide turbinarique isolé de *Turbinaria ornata* par Asari *et al.* (1989) (Tableau 24). Néanmoins, dans notre étude, un seul extrait ($\approx 10 \mu\text{g/mL}$), constitué de composés phénoliques, montre une activité envers les cellules KB du carcinome du larynx, mais cette activité est perdue lorsque l'extrait est testé à une concentration inférieure de $1 \mu\text{g/mL}$. Dans le cadre de notre étude, il n'a donc pas été considéré comme actif. Il aurait été intéressant de tester les fractions semi-purifiées de composés phénoliques obtenues au Chapitre II. Malheureusement la faible quantité de fractions obtenue n'a pas permis la mise en œuvre d'un criblage de l'activité des fractions.

A notre connaissance, cette étude est la première à rapporter l'existence d'extraits hydrométhanoliques actifs de *Turbinaria ornata* et de *Sargassum polycystum* envers les larves de Diptères. Des extraits méthanoliques de microalgues (Denardou-Queneherve *et al.* 1999) et des extraits hexane:dichlorométhane de champignons marins (Landreau *et al.* 2002) ont préalablement montré une telle activité. L'analyse de ces extraits ont révélé la présence de phycotoxines (Denardou-Queneherve *et al.* 1999) et de peptaibols (Landreau *et al.* 2002). L'isolement de nouvelles substances larvicides est un des enjeux majeurs actuels dans la lutte contre les maladies tropicales telles que le paludisme, la dengue, le chikungunya ou encore la filariose. Ces maladies tropicales ont toutes un vecteur commun : les moustiques et principalement ceux des genres *Aedes* et *Culex* (ordre des Diptères). Un des moyens de lutter contre les moustiques, et donc d'endiguer la prolifération des maladies, est la pulvérisation directe de substances larvicides sur les gîtes larvaires. Le principe actif des larvicides biologiques actuels est généralement une protéine cristallisée, synthétisée par la bactérie *Bacillus thuringiensis* var. *israeliensis*. Cette protéine a l'avantage d'être toxique uniquement pour les moustiques (Sharma *et al.* 2008). Néanmoins, la **recherche de nouvelles substances larvicides/insecticides et respectueuses de l'environnement reste un des enjeux de la lutte contre les moustiques.** C'est pourquoi il serait intéressant de poursuivre l'isolement des molécules responsables de l'activité contre les larves de diptères. Les résultats obtenus dans le cadre de cette thèse en milieu tropical sont ponctuels : ils ne concernent que des prélèvements effectués à un moment donné dans l'année. Des travaux antérieurs sur les activités anti-inflammatoires de *Sargassum wightii* (Dar *et al.* 2007) ont montré que l'activité des extraits variaient en fonction des saisons. Nos résultats mettent, quant à eux, en évidence l'existence d'une variation spatiale des activités étudiées. Cette variation est très bien illustrée par l'exemple suivant : les extraits apolaires de *Turbinaria decurrens* d'Anuta Paina Island, de *T. conoides* de Lau Lagoon (îles Salomon) et de *Sargassum aquifolium* de Prony 1 (Nouvelle Calédonie) montrent une

activité anti-inflammatoire (anti-PLA₂) alors que ceux de *T. decurrens* de Lau Lagoon, de *T. conoides* de Nggela NW (îles Salomon) et de *S. aquifolium* de Prony 2 (Nouvelle Calédonie) ne présentent aucune activité significative. Cette variabilité de l'activité, qu'elle soit saisonnière ou spatiale, est à prendre en compte dans une future prospective d'utiliser cette forte biomasse des Sargassaceae tropicales pour d'autres tests d'activités ou pour une éventuelle exploitation des champs de sargasses dans le Pacifique Sud.

Tableau 24 : Liste non exhaustive de composés issus de macroalgues et présentant des activités anti-inflammatoire, cytotoxique ou neurotoxique. Concernant l'activité cytotoxique, seuls les composés issus de Phaeophyceae ont été pris en compte dans un souci de clarté. En gras sont indiqués les espèces de Sargassaceae et leurs composés actifs.

Activités	Composés	Source (espèces)	Références (review)
Cytotoxique	Stypodiol	<i>Stypopodium flabelliforme</i>	Mayer 1999
	Cryptoxanthin	<i>Ecklonia stolonifera</i>	
	Mediterraneol A	<i>Cystoseira mediterranea</i>	Ioannou et Roussis 2009
	Mediterraneone		
	Cystoseirol	<i>Cystoseira usneoides</i>	
	Usneoidone E		
	Dictyotalide B	<i>Dictyota dichotoma</i>	
	Diterpene		
	Dictyotine B	<i>Dilophus ligulatus</i>	
	Dilopholide		
	Dictyotine B	<i>Pachydictyon coriacerum</i>	
	24-hydroperoxy-24-vinyl-cholesterol	<i>Padina pavonica</i>	
	Hydroxysargaquinone	<i>Sargassum tortile</i>	
	Sargasal I		
	Sargasal II		
	Spatol	<i>Spatoglossum schmittii</i>	
14-keto-stypodiol diacetate	<i>Stypopodium flabelliforme</i>		
Stypoldione	<i>Stypopodium zonale</i>		
Oxygenated fucostérol	<i>Turbinaria conoides</i>		
Hydroperoxy-sterols			
Acide turbinarique	<i>Turbinaria ornata</i>		
Anti-inflammatoire	Sterol glycoside	<i>Ulva lactuca</i>	Mayer et Hamann 2004
	Phlorofucofuroeckol-B	<i>Eisenia arborea</i>	Mayer <i>et al.</i> 2009
	Acide hexadecatetracnoïque	<i>Undaria pinnatifida</i>	Ioannou et Roussis 2009
Acide Octadecatetracnoïque			
Neurotoxique	Acide Sargaquinoïque	<i>Sargassum macrocarpum</i>	Ioannou et Roussis 2009
	Oligsaccharide	<i>Ecklonia kurome</i>	

3.2. Isolement de biomolécules actives par bio-guidage

3.2.1. Isolement de molécules à activité anti-inflammatoire

Notre étude chimique a permis l'identification d'acides gras présents dans les fractions anti-inflammatoires de *Sargassum aquifolium* et de *Turbinaria conoides*. De nombreuses études rapportent la présence d'acides gras chez les macroalgues (e.g. Li *et al.* 2002, Sanchez-Machado *et al.* 2004). Concernant les algues brunes et les Sargassaceae en particulier, Khotimchenko (1991) a étudié la composition en acides gras de 7 espèces du genre *Sargassum*. L'acide palmitique (16 : 0) est l'acide gras retrouvé en majorité chez ces 7 espèces étudiées. De même, d'importantes concentrations en acides gras polyinsaturés comprenant 18 ou 20 atomes de carbone (C18 et C20) sont également rencontrées chez ces 7 espèces de Sargasses. Dans leur étude, Li *et al.* (2002) observent que les acides gras majoritaires chez *Sargassum kjellmanianum* et *S. thunbergii* récoltées en Mer de Bohai sont l'acide myristique (14:0), l'acide palmitique (16:0), l'acide eicosatétraénoïque (20:4n6), l'acide linoléïque (18:2n6) et l'acide docosahexanoïque (22:6, n-3). Concernant les Sargassaceae tropicales, Zubia (2003) a rapporté la composition en acides gras de *Sargassum pacificum* (anciennement *S. mangarevense*) et de *Turbinaria ornata* de Polynésie Française. Ces deux espèces montrent une composition similaire avec, comme acides gras majoritaires, l'acide palmitique, l'acide oléïque (18:1n9) et l'acide arachidonique. Les acides myristique, linoléïque, octadiénoïque (18:2n9) et eicosatétraénoïque sont rapportés par Zubia (2003) comme étant en quantité assez importante dans les deux algues. Ainsi, *S. pacificum* présente des quantités en acides palmitoléïque (16:1n7) et docosanoïque (22:0) plus importante que *T. ornata*. En ce qui concerne les Sargassaceae de milieu tempéré, Plouguerné *et al.* (2009) ont étudié la composition de fractions antifouling de *S. muticum*. Une des fractions étudiées contient des acides gras de types acide palmitique, acide linoléique, acide palmitoléïque, acide myristique, acide arachidonique et acide linoléïque.

Dans le cadre de notre étude, la composition des fractions anti-inflammatoires de *S. aquifolium* et *T. conoides* récoltées aux îles Salomon a été étudiée et a révélé la présence, pour chacune des espèces, d'acide palmitique, d'acide oléïque (18:1n9), d'acide stéarique (18:0) et d'acide linoléïque. Ces résultats sont cohérents avec les observations antérieures de Khotimchenko (1991), Li *et al.* (2002), Zubia *et al.* (2003), Plouguerné (2006).

Les acides gras d'algues brunes et en particulier d'espèces du genre *Sargassum* ont déjà été cités comme anti-inflammatoires (Kang *et al.* 2008). Cependant, à notre connaissance, c'est la première fois que des acides gras issus de Sargassaceae tropicales inhibent la Phospholipase A₂ de venin d'abeille. De plus, notre étude corrobore les résultats rapportés par Ledon *et al.* (2003, 2005, 2007). En effet, ces auteurs ont

montré qu'un mélange d'acide gras composé d'acides palmitique, oléique, linoléique et linolénique issus de la canne à sucre (*Saccharum officinarum*) était actif sur plusieurs modèles inflammatoires. Nos résultats sont donc prometteurs, même s'il faut prendre des précautions en comparant un test anti-inflammatoire *in vivo* avec des tests *in vitro* tel que le test anti-PLA₂. De ce fait, des études complémentaires devront être menées afin, d'une part, d'identifier les mécanismes d'action mis en œuvre lors de l'inhibition de la phospholipase A₂ par les acides gras et d'autre part, de tester ce mélange d'acides gras actifs sur d'autres modèles d'inflammations et en particulier sur des modèles *in vivo*.

3.2.2. Isolement de molécules à activité anti-radicalaire

Notre étude chimique de l'extrait dichlorométhane:méthanol (2:1, v:v) de *Bifurcaria bifurcata* a révélé la présence d'un diterpène linéaire présentant une activité antiradicalaire : l'éléganolone.

L'éléganolone a été identifié pour la première fois chez *Cystoseira elegans* par Francisco *et al.* en 1978 (Kornprobst 2005) puis ce composé a été isolé chez *Bifurcaria bifurcata* par Biard *et al.* (1980).

L'éléganolone est antimicrobien (Biard *et al.* 1980), présente des activités anti-arythmie (Della Pieta *et al.* 1993) et anti-mitotique (Tringali 1997) chez le cochon d'inde ainsi que des activités antifouling (Geraci *et al.* 1999, Hellio *et al.* 2001). A notre connaissance, c'est la première fois qu'une activité antiradicalaire est rapportée pour ce composé.

3.3. Tests d'activités biologiques des molécules isolées

En plus de l'activité antiradicalaire présentée dans le paragraphe précédent, l'éléganolone présente également une activité antioxydante (qui limite le blanchiment du β -carotène). C'est la première fois que de telles activités sont mises en évidence pour ce composé. Néanmoins, l'EC₅₀ et l'EC₇₀₀ de l'éléganolone sont plus élevés que ceux des antioxydants de synthèse. En effet, l'éléganolone présente un EC₅₀ environ 3,5 fois supérieur et un EC₇₀₀ presque 10 fois supérieur à celui de la vitamine E (ou α -tocophérol). De même, la fucoxanthine isolée de *Sargassum muticum* présente des activités antiradicalaires et antioxydantes inférieures aux antioxydants industriels. Le pouvoir antioxydant de ces deux composés n'est donc pas très élevé. Néanmoins, les résultats concernant la fucoxanthine corroborent les précédents travaux sur les activités antioxydantes de cette substance (Nomura *et al.* 1997, Le Tutour *et al.* 1998, Yan *et al.* 1999, Sachindra *et al.* 2007).

Aucune de ces deux molécules ne présente d'activités neurotoxique, cytotoxique ou anti-inflammatoire. Pourtant, la fucoxanthine est connue pour son action anti-prolifération sur différentes lignées cellulaires cancéreuses (Hosokawa *et al.* 2004, Das *et al.* 2005, Nakazawa *et al.* 2009). Aucun des autres pools de composés testés (fractions B-BbPM, To-CCM-3 et Tc-CCM-3) ne présente d'activité. Pourtant, à la vue des résultats précédents concernant l'activité cytotoxique de l'acide turbinarique (Asari *et al.* 1989) d'une part et les activités anti-inflammatoires des pools d'acides gras montrés précédemment (Le Lann *et al.* à soumettre) d'autre part, nous nous attendions à retrouver ces activités au moins dans les fractions To-CCM-3 et Tc-CCM-3. Néanmoins aucune de ces deux fractions ne présente d'activité anti-inflammatoire significative. Cette absence d'activité peut s'expliquer de différentes manières. D'une part, dans leurs travaux, Asari *et al.* (1989) ont testé l'activité cytotoxique d'un acide turbinarique de synthèse, et non de l'acide turbinarique isolé de l'échantillon algal. D'autre part, les lignées cellulaires ne sont pas les mêmes entre les deux études. Asari *et al.* (1989) ont utilisé des cellules de mélanome de souris et des cellules humaines du carcinome du colon. Notre étude a porté sur des cellules humaines du carcinome du larynx. De plus, dans notre étude, l'acide turbinarique n'a pas été testé pur. En effet, ce composé n'est présent qu'à 16,5% dans la fraction testée en cytotoxicité (fraction Tc-CCM-3). Il serait donc intéressant d'isoler l'acide turbinarique, des fois que les acides gras présents dans la fraction inhibent son activité.

Concernant l'activité anti-inflammatoire, nos résultats mettent en évidence l'importance de la composition du pool d'acides gras, tant du point de vue qualitatif que quantitatif, dans la présence ou non de l'activité anti-inflammatoire.

Conclusion - Synthèse

Ce Chapitre met en évidence, chez certaines espèces de Sargassaceae, l'existence d'extraits ou de composés à activités anti-inflammatoire (anti-PLA₂), cytotoxique, neurotoxique, antiradicalaire et antioxydante. Cette étude est loin d'être exhaustive. En effet elle ne s'est intéressée qu'à un très petit nombre d'activités via des tests *in vivo* et à seulement deux types d'extraits (hydrométhanoliques et lipidiques). Il serait néanmoins intéressant de poursuivre les investigations concernant d'une part la composition des extraits neurotoxiques et anti-inflammatoires et d'autre part d'effectuer d'autres tests biologiques sur les molécules isolées.

Ainsi, notre travail ne constitue qu'une part de la première étape d'un long processus qui peut sembler hasardeux. En effet, comme le montre le Tableau 25, le développement de nouvelles substances parapharmaceutiques / pharmaceutique nécessite beaucoup de temps. En effet, entre 10 à 20 ans sont

nécessaires avant qu'une molécule ne soit commercialisable sous la forme d'un produit (médicament, cosmétiques...). De plus, d'après Di Masi *et al.* (1995), seulement 0,01 % des molécules testées *in vitro* reçoivent un agrément de mise sur le marché.

Tableau 25 : Résumé des étapes de Recherche & Développement pour la mise sur le marché d'un nouveau médicament (d'après Di Masi *et al.* 1995, Kornprobst 2005). Le cadre orange repositionne notre étude dans le contexte d'un programme de Recherche & Développement d'un principe actif.

Etapes de Recherche & Développement		Nombre de molécules	Durée minimale des travaux (années)
Recherche	Recherche fondamentale – tests <i>in vitro</i>	10 000	
	Création d'un composé « leader »	20	3 à 5
	Amélioration du « leader »		
	Tests <i>in vivo</i> sur des animaux	10	2
	Tests cliniques sur l'homme → Phase I (tolérance au produit)	5	2
Développement	Tests cliniques sur l'homme → Phase II (intérêt thérapeutique)	1	2
	Tests cliniques sur l'homme → Phase III (essais à grande échelle)		3
Rendement : 0,01%	Obtention de l'autorisation de mise sur le marché → commercialisation	1	1
	Surveillance pharmacologique, Amélioration & Nouvelles indications → phase IV	1	Indéterminée

Néanmoins, les résultats obtenus au cours de cette thèse, sur les différentes espèces de milieux tempérés et tropicales, ont permis de mettre en avant le **potentiel chimique de la famille Sargassaceae**. Ce potentiel est **renforcé par le caractère cosmopolite** de ces Phaeophyceae. En effet, **que ce soit en milieu tempéré ou en milieu tropical, les Sargassaceae présentent des substances actives**. Ainsi le potentiel que laisse entrevoir ces espèces nous encourage vivement à poursuivre le travail entrepris dans le but d'identifier de nouvelles substances d'origine naturelle et donc de valoriser la biomasse que représente ces algues brunes.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Synthèse

Ce travail **pluridisciplinaire** effectué au cours de cette thèse a porté sur :

- l'étude de l'écologie chimique des Sargassaceae via le dosage de différents composés et de l'estimation de leurs activités antioxydantes associées ;
- la recherche de marqueurs chimiques au niveau spécifique chez le genre *Turbinaria* et au niveau intraspécifique pour l'espèce *Bifurcaria bifurcata* ;
- la recherche de composés potentiellement bioactifs via des tests de cytotoxicité, de neurotoxicité et des tests anti-inflammatoires.

Ainsi, dans la première partie de ce travail (Chapitre II), nous nous sommes intéressées à l'écologie chimique de différents genres de Sargassaceae de milieux tempérés et tropicaux. Ces genres étaient : les genres *Cystoseira*, *Bifurcaria* et *Sargassum* en milieu tempéré et les genres *Turbinaria* et *Sargassum* en milieu tropical. Dans les deux milieux considérés, nous nous sommes intéressées aux pools de composés phénoliques et aux teneurs en fucoxanthine retrouvées dans les différentes espèces étudiées, ainsi qu'aux activités antioxydantes de ces deux types de composés (phlorotannins et fucoxanthine), afin d'**étudier les stratégies de défense mises en place par ces algues brunes**. En plus de ces travaux, en milieu tempéré, nous avons caractérisé l'évolution des populations de *Sargassum muticum*, *Bifurcaria bifurcata* et *Cystoseira baccata*. Les nombreux résultats obtenus de cette étude sont résumés ci-dessous.

En ce qui concerne l'évolution spatio-temporelle des populations de Sargassaceae en milieu tempéré, nous avons mis en évidence la **plasticité phénotypique présentée par *Sargassum muticum***, espèce introduite, **à la différence des deux espèces natives** de Sargassaceae étudiées (*Bifurcaria bifurcata* et *Cystoseira baccata*). En effet, **la densité et la taille des individus de *S. muticum* sont fortement influencées par l'hydrodynamisme et le substrat**. Ces résultats corroborent ceux de Plouguerné *et al.* (2006). Néanmoins, malgré la plasticité phénotypique de l'espèce introduite, *S. muticum*, les trois espèces semblent être en équilibre dans le biotope breton. En effet, sur les deux sites étudiés, **chacune des espèces semble avoir trouvé sa niche écologique**.

En ce qui concerne l'**écologie chimique** des Sargassaceae, nous avons montré que :

- les trois **espèces tempérées** présentent une **variabilité saisonnière des teneurs en composés phénoliques avec un maximum en été et avant leur période de reproduction** ;

- les **teneurs en fucoxanthine** de ces trois espèces de la pointe Bretagne **présentent** aussi **une variabilité spatio-temporelle** ;
- les **espèces tropicales** présentent une **variabilité spatiale des teneurs en composés phénoliques et en fucoxanthine** avec une influence de la géomorphologie et de la profondeur du site ;
- Quel que soit le milieu considéré, la nature (c'est-à-dire la composition) du **pool de composés phénoliques varie avec l'espèce et l'environnement considérés** ;
- Quel que soit le milieu considéré, **les activités antioxydantes** (estimées par les tests de blanchiment du β -carotène et du DPPH) **sont corrélées avec les teneurs en phlorotannins et les extraits pigmentaires**, contenant de la fucoxanthine, **présentent une activité antiradicalaire**.

Dans la deuxième partie de ce travail présenté (Chapitre III), grâce à un travail de chimie, nous avons pu :

- d'une part, mettre en évidence l'existence d'un composé spécifique à l'espèce *Turbinaria conoides* : l'acide turbinarique. Cette molécule ne se retrouve ni chez *Turbinaria ornata* ni chez *Turbinaria decurrens*. **L'acide turbinarique est donc un chimiomarqueur de l'espèce *Turbinaria conoides*** ;
- d'autre part, mettre en évidence **l'existence d'écotypes chez *Bifurcaria bifurcata***. Ces écotypes sont caractérisés par une synthèse préférentielle de composés terpéniques en fonction des conditions environnementales. Dans le cadre de notre étude, nous avons identifié **la bifurcanone** ou [3-((3E,7E)-10-oxo-4,8,12-trimethyltrideca-3,7,11-trienyl)furan], un diterpène comportant un cycle furane. Ce composé est minoritaire chez les algues récoltées dans des sites de mode battu.

Dans la dernière et troisième partie de cette thèse (Chapitre IV), le travail effectué a abouti à l'isolement et à la caractérisation structurale de composés présentant des activités biologiques.

Ainsi, nous avons pu **identifier des composés anti-inflammatoires** (inhibition de l'activité de la phospholipase A₂) présents dans les extraits lipidiques de *Sargassum aquifolium* et de *Turbinaria conoides*. Il s'agit de **pools d'acides gras** composés de l'acide palmitique, l'acide stéarique et l'acide oléique chez *Sargassum aquifolium* et de l'acide palmitique, l'acide stéarique, l'acide oléique et de l'acide linoléique chez *Turbinaria conoides*.

Ces pools d'acides gras ne présentent ni activité cytotoxique, ni activité neurotoxique. **Cette étude rapporte pour la première fois l'activité anti-phospholipase A₂ d'acides gras issus d'algues brunes de la famille des Sargassaceae.**

De même, nous avons caractérisé un composé présentant des activités antioxydantes (estimées par les tests de blanchiment du β -carotène et du DPPH) mais n'étant pas cytotoxique, neurotoxique ni anti-inflammatoire. Il s'agit de l'éléganolone, un diterpène linéaire, isolé et caractérisé à partir d'un extrait lipidique de *Bifurcaria bifurcata*. **C'est la première fois que l'activité antiradicalaire en antioxydante de l'éléganolone est démontrée.**

Au cours de cette dernière partie, nous avons également montré que la fucoxanthine, purifiée de *Sargassum muticum*, était active en tant que antioxydants (via les tests de blanchiment du β -carotène et du DPPH) mais qu'elle ne présentait aucune activité cytotoxique, neurotoxique ou anti-inflammatoire. De plus, les composés caractérisés au cours du Chapitre II ont aussi été testés sur ces 5 activités, mais aucun d'entre eux n'a montré une activité significative.

Perspectives

Ainsi, les conclusions apportées par cette étude de Doctorat permettent de définir les perspectives à envisager pour la suite du travail :

- Poursuivre le suivi écologique de *Bifurcaria bifurcata* et *Cystoseira baccata* et l'élargir aux autres espèces de Sargassaceae tempérées, à savoir les espèces du genre *Halydris* et *Cystoseira*. En effet, d'une part, la biologie de ces populations est encore mal connue et d'autre part les études portant sur une grande échelle de temps représentent une source très importante d'information pour l'étude de la biologie des populations. Il est à noter qu'une thèse portant, entre autre, sur la biologie des populations des 5 espèces du genre *Cystoseira* retrouvées en pointe Bretagne est actuellement en cours (Thèse de C. Jegou) ;
- Mettre en place une étude de biologie des populations avec un suivi spatio-temporel de la composition du pool de composés terpéniques chez *Bifurcaria bifurcata* afin de mieux caractériser les écotypes mis en évidence chez cette algue et d'identifier les rôles biologiques des terpènes chez cette espèce.
- Etudier la biologie des populations, via des suivis spatio-temporels, des espèces de Sargassaceae tropicales. Les biologies des populations de *Sargassum pacificum* et de *Turbinaria ornata* sont bien connues, ce qui n'est pas le cas pour la majorité des autres espèces de Sargassaceae tropicales. De plus, *T. ornata* et *T. conoides* étant deux espèces sœurs, proches morphologiquement et génétiquement, nous pouvons donc légitimement nous demander ce qu'il en est de leurs dynamiques populationnelles respectives ;

- Mettre au point une technique de dosage de l'acide turbinarique afin d'étudier les variations spatio-temporels de ce composé ;
- Rechercher l'acide turbinarique chez d'autres espèces de *Turbinaria* ;
- Développer de nouveaux tests d'activités de l'acide turbinarique, de l'éléganolone, de la bifurcane et de la fucoxanthine afin d'évaluer au mieux leurs spectres d'activités, avec notamment d'autres tests antioxydants *in vitro* tels que les tests TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter) ou bien encore FOX (ferrous oxidation-xylenol orange).
- Développer de nouveaux tests d'activités anti-inflammatoires *in vivo* tels que les tests d'œdèmes induits par différents produits chez le rat et/ou la souris afin de déterminer le réel potentiel anti-inflammatoire de pool d'acides gras caractérisé chez *Sargassum aquifolium* et *Turbinaria conoides*.

Conclusion générale

Ce travail pluridisciplinaire réalisé chez plusieurs espèces d'algues brunes appartenant à la famille des Sargassaceae, peut s'inscrire dans un processus de recherche de nouveaux composés à activités biologiques et ce, dans une perspective d'exploitation industrielle et commerciale. En effet, les substances d'origine naturelle sont une des voies prometteuses pour l'élaboration de nouveaux principes actifs dans l'industrie pharmaceutique et parapharmaceutique. Néanmoins dans le cadre d'une éventuelle exploitation des ressources naturelles, l'identification correcte des espèces exploitées est primordiale et indispensable. De plus, comme notre étude le démontre, si l'on veut étudier les métabolites secondaires, à des fins industrielles ou non, il est indispensable de coupler les études chimiques à des études biologiques telles que des études de biologie des populations afin de mieux appréhender le fonctionnement du métabolisme secondaire des organismes. En effet, la majorité des métabolites secondaires, tels que les composés phénoliques ou les composés terpéniques chez les Sargassaceae, seront synthétisés en réponse aux facteurs de l'environnement et selon l'état physiologique de l'organisme. Ces données écologiques sont donc indispensables afin de fournir des informations quant aux périodes de récolte à privilégier afin d'obtenir le meilleur rendement possible, mais aussi dans un souci de gestion durable de la biomasse.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(2008) ID N° 1115 : France - Les Lagons de la Nouvelle-Calédonie: Diversité Récifale et Écosystèmes Associés. Rapport de l'UICN au Comité du patrimoine mondial pp 59

A

- Abdala-Díaz RT, Cabello-Pasini A, Pérez-Rodríguez E, Conde Álvarez RM, Figueroa FL (2006) Daily and seasonal variations of optimum quantum yield and phenolic compounds in *Cystoseira tamariscifolia* (Phaeophyta). *Journal of Phycology* 148: 459-465
- Abdel-Fattah A, Hussain M, Salem H (1973) Sargassan: a sulphated heteropolysaccharide from *Sargassum linifolium*. *Phytochem* 12: 1995-1998
- Abourriche A, Charrouf M, Berrada M, Bennamara A, Chaib N, Francisco C (1999) Antimicrobial activities and cytotoxicity of the brown alga *Cystoseira tamariscifolia*. *Fitoterapia* 70: 611-614
- Aburto-Oropeza O, Sala E, Paredes G, Mendoza A, Ballesteros E (2007) Predictability of reef fish recruitment in a highly variable nursery habitat. *Ecology* 88: 2220-2228
- Ahn M, Yoon K, Kim C, Min S, Kim Y, Kim H, Kim J, Shin C, Lee C, Kim T (2002) Inhibition of HIV-1 reverse transcriptase and HIV-1 integrase and antiviral activity of Korean seaweed extracts. *Journal of Applied Phycology* 14: 325-329
- Airs RL, Atkinson JE, Keely BJ (2001) Development and application of a high resolution liquid chromatographic method for the analysis of complex pigment distributions. *Journal of Chromatography A* 917: 167-177
- Akamatsu E, Shimanaga M, Kamei Y (2003) Isolation of an anti-influenza virus substance, MC26 from a marine brown alga, *Sargassum piluliferum* and its antiviral activity against influenza virus. Coastal Bioenvironment-Saga University (Japan)
- Amsler CD, Fairhead VA (2006) Defensive and Sensory chemical ecology of brown algae. *Advances in Botanical Research* 43: 1-91
- Ananthi S, raghavendran HrB, Sunil AG, Gayathri V, Ramakrishnan G, Vasanthi HR (In Press) Invitro antioxidant and Invivo anti-inflammatory potential of crude polysaccharide from *Turbinaria ornata* (Brown Alga). *Food and Chemical Toxicology* In Press, Accepted Manuscript
- Andréfouët SA, Cabioch G, Flammand B, Pelletier B (2007) The diversity of New Caledonia coral reef geomorphology and genetic processes: a synthesis from optical remote sensing, coring and acoustic multi-beam observations. *Doc. Sci. Tech.* II7
- Anggadiredja J, Andyani R, Hayati, Muawanah (1997) Antioxidant activity of *Sargassum polycystum* (Phaeophyta) and *Laurencia obtusa* (Rhodophyta) from Seribu Islands. *Journal of Applied Phycology* 9: 477-479
- Ara J, Sultana V, Ehteshamul-Haque S, Qasim R, Ahmad V (1999) Cytotoxic activity of marine macro-algae on *Artemia salina* (brine shrimp). *Phytotherapy Research* 13: 304 - 307
- Arenas F, Fernandez C, Rico JM, Fernandez E, Haya D (1995) Growth and reproductive strategies of *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt and *Cystoseira nodicaulis* (With.) Roberts. *Scientia Marina* 59: 1-8
- Arenas F, Sanchez F, Fernandez C, Hawkins SJ (2003) The impact of the invasive species on European shores : the case of *Sargassum muticum* in intertidal rock pools. In: Maggs C (ed) *Third European Phycological Congress*. Taylor & Francis Group, Belfast, Northern Ireland, pp 49
- Arisawa M, Hayashi K, Nikaido T, Koike K, Fujita D, Nunomura N, Tanaka M, Sasaki T (1997) Screening of some marine organism extracts for cAMP phosphodiesterase inhibition, cytotoxicity, and antiviral activity against Hsv-1. *Pharmaceutical Biology* 35: 6-11
- Arnold T, Targett N (2002) Marine tannins: the importance of a mechanistic framework for predicting ecological roles. *Journal of Chemical Ecology* 28: 1919-1934
- Arnold TM, Tanner CE, Hatch WI (1995) Phenotypic variation in polyphenolic content of the tropical brown alga *Lobophora variegata* as a function of nitrogen availability. *Marine Ecology Progress Series* 123: 177-183
- Arnold TM, Targett NM (2000) Evidence for metabolic turnover of polyphenolics in tropical brown algae. *Journal of Chemical Ecology* 26: 1393-1410
- Arrontes J (1990) Composition, distribution on host, and seasonality of epiphytes on three intertidal algae. *Botanica Marina* 33: 205-211
- Arun Kumar K, Rengasamy R (2000a) Antibacterial activities of seaweed extracts/fractions obtained through a TLC profile against the phytopathogenic bacterium *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Botanica Marina* 43: 417-421

- Arun Kumar K, Rengasamy R (2000b) Evaluation of antibacterial potential of seaweeds occurring along the coast of tamil nadu, India against the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (ishiyama) Dye. *Botanica Marina* 43: 409-415
- Arunkumar K, Selvapalam N, Rengasamy R (2005) The antibacterial compound sulphoglycerolipid 1-0 palmitoyl-3-0(6'-sulpho- α -quinovopyranosyl)-glycerol from *Sargassum wightii* Greville (Phaeophyceae). *Botanica Marina* 48: 441-445
- Asari F, Kusumi T, Kakisawa H (1989) Turbinaric acid, a cytotoxic secosqualene carboxylic acid from the brown alga *Turbinaria ornata*. *Journal of Natural Products* 52: 1167-1169

B

- Balaji Raghavendran HR, Sathivel A, Devaki T (2005) Antioxidant effect of *Sargassum polycystum* (Phaeophyceae) against acetaminophen induced changes in hepatic mitochondrial enzymes during toxic hepatitis. *Chemosphere* 61: 276-281
- Bazes A, Silkina A, Douzenel P, Faÿ F, Kervarec N, Morin D, Berge J-P, Bourgougnon N (2009) Investigation of the antifouling constituents from the brown alga *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt. *Journal of Applied Phycology* 21: 395-403
- Bellessort B, Migniot C (1987) Côtes de la Manche et de l'Atlantique, de la Baie du Mont-Saint-Michel à la frontière espagnole. Partie A: de la Baie du Mont-Saint-Michel à la Loire. . In: Bellessort B, Migniot C (eds) Catalogue sédimentologique des côtes françaises, Paris, pp 559
- Bennamara A, Abourriche A, Berrada M, Charrouf Mh, Chaid N, Boudouma M, Garneau FX (1999) Methoxybifurcarenone: an antifungal and antibacterial meroditerpenoid from the brown alga *Cystoseira tamariscifolia*. *Phytochemistry* 52
- Biard JF, Verbist JF, Letourneux Y, Floch R (1980) Diterpene Ketols with Antimicrobial Activity from *Bifurcaria bifurcata*. *Planta Medica* 40: 288-294
- Bjerke JW, Gwynn-Jones D, Callaghan TV (2005) Effects of enhanced UV-B radiation in the field on the concentration of phenolics and chlorophyll fluorescence in two boreal and arctic-alpine lichens. *Environmental and Experimental Botany* 53: 139-149
- Bocheva A, Mikhova B, Taskova R, Mitova M, Duddeck H (2003) Antiinflammatory and analgesic effects of *Carthamus lanatus* aerial parts. *Fitoterapia* 74: 559-563
- Boettcher A, Targett N (1993) Role of polyphenolic molecular size in reduction of assimilation efficiency in *Xiphister mucosus*. *Ecology*: 891-903
- Bonhommeau S, Chassot E, Rivot E (2008) Fluctuations in European eel (*Anguilla anguilla*) recruitment resulting from environmental changes in the Sargasso Sea. *Fisheries Oceanography* 17: 32-44
- Boudouresque CF, Verlaque M (2002) Biological pollution in the Mediterranean Sea: invasive versus introduced macrophytes. *Marine Pollution Bulletin* 44: 32-38
- Britton-Simmons KH (2004) Direct and indirect effects of the introduced alga *Sargassum muticum* on benthic, subtidal communities of Washington State, USA. *Marine Ecology Progress Series* 277: 61-78
- Brock E, Aberg P, Pavia H (2001) Phlorotannins as chemical defense against macroalgal epiphytes on *Ascophyllum nodosum*. *Journal of Phycology* 37: 8-8
- Brock E, Nylund GM, Pavia H (2007) Chemical inhibition of barnacle larval settlement by the brown alga *Fucus vesiculosus*. *Marine Ecology Progress Series* 337: 165-174

C

- Cabioc'h J, Floch J-Y, Le Toquin A, Boudouresque C-F, Meinesz A, Verlaque M (2006) Guide des algues des mers d'Europe. Delachaux et Niestlé SA, Paris, pp 272
- Cabioch J (1981) Notes originales sur la faune, la flore et les conditions écologiques marines de la régions de Roscoff. Premières observations de l'algue Japonaise *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt dans la région de Roscoff. *Travaux de la Station Biologique de Roscoff* 27: 1-2
- Caccamese S, Azzolina R, Furnari G, Cormaci M, Grasso S (1980) Antimicrobial and antiviral activities of extracts from mediterranean algae. *Botanica Marina* 23: 285-288
- Caccamese S, Azzolina R, Furnari G, Cormaci M, Grasso S (1981) Antimicrobial and antiviral activities of some marine algae from Eastern Sicily. *Botanica Marina* 24: 365-367

- Caccamese S, Toscano RM, Furnari G, Cormaci M (1985) Antimicrobial activities of red and brown algae from Southern Italy Coast. *Botanica Marina* 28: 505-507
- Calder P (1998) Immunoregulatory and anti-inflammatory effects of n-3 polyunsaturated fatty acids. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 31: 467-490
- Calder P (2009a) Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: New twists in an old tale. *Biochimie* 91: 791-795
- Calder P (2009b) The Use of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids as Therapeutic Agents for Inflammatory Diseases. *Immunology, Endocrine & Metabolic Agents - Medicinal Chemistry* 9: 45-54
- Calder PC (2006) Polyunsaturated fatty acids and inflammation. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 75: 197-202
- Campbell NA (1995) *Biologie*. De Boeck Université, Bruxelles, pp 1190
- Caron L, Douady D, De Martino A, Quinet M (2001) Light harvesting in brown algae. *Cahiers de Biologie Marine* 42: 109-124
- Carvalho JCT, Sertie JAA, Barbosa MVJ, Patricio KCM, Caputo LRG, Sarti SJ, Ferreira LP, Bastos JK (1999) Anti-inflammatory activity of the crude extract from the fruits of *Pterodon emarginatus* Vog. *Journal of Ethnopharmacology* 64: 127-133
- Castric-Faey A, Girard-Descatoire A, L'Hardy-Halos M-T, Derrien-Courtet S (2001) La vie sous-marine en Bretagne. *Découverte des fonds rocheux. Région Bretagne*, pp 176
- Cavalier-Smith T (2004) Only six kingdoms of life. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 271: 1251-1262
- Chamberlain AHL, Gorham J, Kane DF, Lewey SA (1979) Laboratory growth studies on *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt III. Apical dominance. *Botanica Marina* 22: 11-19
- Chandini SK, Ganesan P, Bhaskar N (2008) In vitro antioxidant activities of three selected brown seaweeds of India. *Food Chemistry* 107: 707-713
- Chattopadhyay N, Ghosh T, Sinha S, Chattopadhyay K, Karmakar P, Ray B (2009) Polysaccharides from *Turbinaria conoides*: structural features and antioxidant capacity. *Food Chemistry* In Press, Accepted Manuscript
- Chen Y, Yan X, Fan X (1997) A Hypothesis on Phaeophyceae Polyphenols: Their Structural Unit and Mechanism of the Formation. *Oceanologia et Limnologia Sinica* 28: 225-232
- Chew YL, Lim YY, Omar M, Khoo KS (2008) Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia. *LWT - Food Science and Technology* 41: 1067-1072
- Cho GY, Rousseau F, De Reviers B, Boo SM (2006) Phylogenetic relationships within the Fucales (Phaeophyceae) assessed by the photosystem I coding *psaA* sequences. *Phycologia* 45: 512-519
- Christie WW (2003) *Lipid Analysis: Isolation, Separation, Identification and Structural Analysis of Lipids*, Third Edition. The Oily Press, PJ Barnes & Associates, Bridgwater, England, pp
- Collèn J, Davison IR (1999) Reactive oxygen production and damage in intertidal *Fucus* spp. (Phaeophyceae), pp 54-61
- Connan S (2004) Etude de la diversité spécifique des macroalgues de la pointe de la Bretagne et analyse des composés phénoliques des Phéophycées dominantes. *Biologie. Sciences, Brest-Plouzané*, pp 1-265
- Connan S, Delisle F, Deslandes E, Ar Gall E (2006) Intra-thallus phlorotannins content and antioxidant activity in Phaeophyceae of temperate waters. *Botanica Marina* 49: 39-46
- Connan S, Deslandes E, Gall EA (2007) Influence of day-night and tidal cycles on phenol content and antioxidant capacity in three temperate intertidal brown seaweeds. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 349: 359-369
- Connan S, Goulard F, Stiger V, Deslandes E, Ar Gall E (2004) Interspecific and temporal variation in phlorotannin levels in an assemblage of brown algae. *Botanica Marina* 47: 410-416
- Contreras L, Moenne A, Correa JA (2005) Antioxidant responses in *Scytosiphon lomentaria* (Phaeophyceae) inhabiting copper-enriched coastal environments. *J. Phycol.* 41: 1184-1195
- Couvelard X (2007) Structure et dynamique des jets barotropes créés par les îles du Pacifique Sud-Ouest. Thèse de doctorat, Toulouse, pp 229
- Couvelard X, Marchesiello P, Gourdeau L, Lefèvre J (2008) Barotropic zonal jets induced by islands in the southwest Pacific. *Journal of Physical Oceanography* 38: 2185-2204
- Critchley AT, Farnham WF, Yoshida T, Norton TA (1990) A bibliography of the invasive alga *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt (Fucales, Sargassaceae). *Botanica Marina* 33: 551-562

- Cronin G, Hay M (1996a) Effects of light and nutrient availability on the growth, secondary chemistry, and resistance to herbivory of two brown seaweeds. *Oikos* 77: 93-106
- Cronin G, Hay ME (1996b) Susceptibility to herbivores depends on recent history of both the plant and animal. *Ecology* 77: 1531-1543
- Cruz-Rivera E, Hay M (2001) Macroalgal traits and the feeding and fitness of an herbivorous amphipod: the roles of selectivity, mixing, and compensation. *Marine Ecology Progress Series* 218: 249-266
- Culioli G, Daoudi M, Mesguiche V, Valls R, Piovetti L (1999a) Geranylgeraniol-derived diterpenoids from the brown alga *Bifurcaria bifurcata*. *Phytochemistry* 52: 1447-1454
- Culioli G, Daoudi M, Ortalo-Magné A, Valls R, Piovetti L (2001) (*S*)-12-Hydroxygeranylgeraniol-derived diterpenes from the brown alga *Bifurcaria bifurcata*. *Phytochemistry* 57: 529-535
- Culioli G, Di Guardia S, Valls R, Piovetti L (2000) Geranylgeraniol-derived diterpenes from the brown alga *Bifurcaria bifurcata*: comparison with two other Cystoseiraceae species. *Biochemical systematics and ecology* 28: 185-187
- Culioli G, Mesguiche V, Piovetti L, Valls R (1999b) Geranylgeraniol and geranylgeraniol-derived diterpenes from the brown alga *Bifurcaria bifurcata* (Cystoseiraceae). *Biochemical systematics and ecology* 27: 665-668
- Culioli G, Ortalo-Magné A, Daoudi M, Thomas-Guyon H, Valls R, Piovetti L (2004) Trihydroxylated linear diterpenes from the brown alga *Bifurcaria bifurcata*. *Phytochemistry* 65: 2063-2069
- Culioli G, Ortalo-Magné A, Richou M, Valls R, Piovetti L (2002) Seasonal variations in the chemical composition of *Bifurcaria bifurcata* (Cystoseiraceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 30: 61-64
- Curiel D, Bellemeo G, Marzocchi M, Scattolin M, Parisi G (1998) Distribution of introduced Japanese macroalgae *Undaria pinnatifida*, *Sargassum muticum* (Phaeophyta) and *Antithamnion Pectinatum* (Rhodophyta) in the Lagoon of Venice. *Hydrobiologia* 385: 17-22

D

- Daoudi M, Bakkas S, Culioli G, Ortalo-Magne A, Piovetti L, Guiry MD (2001) Acyclic diterpenes and sterols from the genera *Bifurcaria* and *Bifurcariopsis* (Cystoseiraceae, Phaeophyceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 29: 973-978
- Dar A, Baig HS, Saifullah SM, Ahmad VU, Yasmeen S, Nizamuddin M (2007) Effect of seasonal variation on the anti-inflammatory activity of *Sargassum wightii* growing on the N. Arabian Sea coast of Pakistan. *Journal of Experimental Biology and Ecology* 351: 1-9
- Das SK, Hashimoto T, Shimizu K, Yoshida T, Sakai T, Sowa Y, Komoto A, Kanazawa K (2005) Fucoxanthin induces cell cycle arrest at G0/G1 phase in human colon carcinoma cells through up-regulation of p21WAF1/Cip1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1726: 328-335
- Davison IR, Pearson GA (1996) Stress tolerance in intertidal seaweeds. *Journal of Phycology* 32: 197-211
- De Martino A (2000) Etude Biochimique et Moléculaire des antennes collectrices d'énergie à Chl a/c et Fucoxanthine d'algues brunes. Mise au point d'un protocole de transformation génétique de gamétophytes de Laminaires et de Diatomées pour l'étude des connexions Pigments-Protéines. Thèse nouveau doctorat. Biologie, Paris, pp 341 p
- De Revers B (2003a) Biologie et Phylogénie des algues, tome 1. Edition Belin, Paris, pp 255
- De Revers B (2003b) Biologie et Phylogénie des algues, tome 2. Edition Belin, Paris, pp 255
- De Senerpont Domis LN, Fama P, Bartlett AJ, Prud'homme van reine WF, Espinosa CA, Trono GC (2003) Defining taxon boundaries in members of the morphologically and genetically plastic genus *Caulerpa* (Caulerpales Chlorophyta)1. *Journal of Phycology* 39: 1019-1037
- Deal MS, Hay ME, Wilson D, Fenical W (2003) Galactolipids rather than phlorotannins as herbivore deterrents in the brown seaweed *Fucus vesiculosus*. *Oecologia* 136: 107-114
- Della Pietra F, Bilia A, Breschi M, Cinelli F, Morelli I, Scatizzi R (1993) Crude extracts and two linear diterpenes from *Cystoseira balearica* and their activity. *Planta medica* 59: 135
- Denardou-Queneherve A, Grzebyk D, Pouchus YF, Sauviat MP, Alliot E, Biard JF, Berland B, Verbist JF (1999) Toxicity of French strains of the dinoflagellate *Prorocentrum minimum* experimental and natural contaminations of mussels. *Toxicon* 37: 1711-1719
- Deslandes E, Pondaven P, Auperin T, Roussakis C C, Guézennec J, Stiger V, Payri C (2000) Preliminary study of the in vitro antiproliferative effect of a hydroethanolic extract from the subtropical seaweed *Turbinaria ornata*

- (Turner) J. Agardh on a human non-small-cell bronchopulmonary carcinoma line (NSCLC-N6). *Journal of Applied Physiology* 12: 257-262
- Desmoulin F, Bon D, Martino R, Malet-Martino M (2008) Étude critique de l'utilisation de la RMN HR-MAS pour l'analyse des tissus biologiques. *Comptes Rendus Chimie, GERM* 2007 11: 423-433
- Devi K, Suganthy N, Kesika P, Pandian S (2008) Bioprotective properties of seaweeds: In vitro evaluation of antioxidant activity and antimicrobial activity against food borne bacteria in relation to polyphenolic content. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 8: 38-49
- Di Guardia S, Valls R, Mesguiche V, Brunel J-M, Culioli G (1999) Enantioselective syntheses of (-)-Bifurcadiol: a natural antitumor marine product. *Tetrahedron Letters* 40: 8359-8360
- Di Masi J, Grabowski H, Vernon J (1995) R&D costs, innovative output and firm size in the pharmaceutical industry. *International Journal of the Economics of Business* 2: 201-219
- Diez I, Santolaria A, Gorostiaga JM (2003) The relationship of environmental factors to the structure and distribution of subtidal seaweed vegetation of the western Basque coast (N Spain). *Estuarine Coastal and Shelf Science* 56: 1041-1054
- Diez I, Secilla A, Santolaria A, Gorostiaga JM (1999) Phytobenthic intertidal community structure along an environmental pollution gradient. *Marine Pollution Bulletin* 38: 463-472
- Dizerbo A, Herpe E (2007) Liste et répartition des algues marines des côtes françaises de la Manche et l'Atlantique, îles Anglo-normandes incluses. *Anaximandre, Edition scientifiques*, pp 315

E

- El Hattab M, Ben Mesaoud M, Daoudi M, Ortalo-Magné A, Culioli G, Valls R, Piovetti L (2008) Trihydroxylated linear diterpenes from the brown alga *Bifurcaria bifurcata* (Fucales, Phaeophyta). *Biochemical Systematics and Ecology* 36: 484-489
- Ely R, Supriya T, Naik CG (2004) Antimicrobial activity of marine organisms collected off the coast of South East India. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 309: 121-127
- Engel S, Puglisi MP, Jensen PR, Fenical W (2006) Antimicrobial activities of extracts from tropical Atlantic marine plants against marine pathogens and saprophytes. *Marine Biology* 149: 991-1002
- Engelen A, Santos R, Alves C (2003) Demography of the alien species *Sargassum muticum* at its European distribution limit. In: Maggs C (ed) *Third European Phycological Congress*. Taylor & Francis Group, Belfast, Northern Ireland, pp 48
- Engelen AH, Aberg P, Olsen JL, Stam WT, Breeman AM (2005) Effects of wave exposure and depth on biomass, density and fertility of the fucoid seaweed *Sargassum polyceratum* (Phaeophyta, Sargassaceae). *European Journal of Phycology* 40: 149-158
- Engelen AH, Espirito-Santo C, Simoes T, Monteiro C, Serrao EA, Pearson GA, Santos ROP (2008) Periodicity of propagule expulsion and settlement in the competing native and invasive brown seaweeds, *Cystoseira humilis* and *Sargassum muticum* (Phaeophyta). *European Journal of Phycology* 43: 275 – 282

F

- Fairhead V, Amsler C, McClintock J, Baker B (2005) Variation in phlorotannin content within two species of brown macroalgae (*Desmarestia anceps* and *D. menziesii*) from the Western Antarctic Peninsula. *Polar Biology* 28: 680-686
- Fairhead VA, Amsler CD, McClintock JB, Baker BJ (2006) Lack of defense or phlorotannins induction by UV radiation or mesograzers in *Desmarestia anceps* and *D. menziesii* (Phaeophyceae). *Journal of Phycology* 42: 1174-1183
- Farnham WF (1980) Studies on Aliens in the Marina Flora of Southern England. the shore environment 2: 875-892 et 898-903
- Farnham WF, Fletcher RL, Irvine LM (1973) Attached *Sargassum* found in Britain. *Nature* 243: 231-232
- Fisch KM, Böhm V, Wright AD, König GM (2003) Antioxidative meroditerpenoids from the brown alga *Cystoseira crinita*. *Journal of Natural Products* 66: 968-975
- Fletcher RL, Fletcher SM (1975) Studies on the recently introduced brown alga *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt. I. Ecology and Reproduction. *Botanica Marina* 18: 149-156

- Fleury BG, Kelecom A, Periera RC, Teixeira VL (1994) Polyphenols, terpenes and sterols in Brazilian Dictyotales and Fucales (Phaeophyta). *Botanica Marina* 37: 457-462
- Floc'h J-Y (1964) Distribution verticale et écologie des algues marines sur les côtes bretonnes *Penn Ar Bed* 4: 182-190
- Floc'h J-Y (1967) Cartographie de la végétation marine et observations écologiques dans l'archipel de Molène (Finistère). Thèse de 3ème cycle. Faculté des Sciences, pp 135
- Franks F (1998) Freeze-drying of bioproducts: putting principles into practice. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 45: 221-229

G

- Gaylord B, Blanchette CA, Denny MW (1994) Mechanical Consequences of Size in Wave-Swept Algae. *Ecological Monographs* 64: 287-313
- Geiselman J, McConnell O (1981) Polyphenols in brown algae *Fucus vesiculosus* and *Ascophyllum nodosum*: Chemical defenses against the marine herbivorous snail, *Littorina littorea*. *Journal of Chemical Ecology* 7: 1115-1133
- Geraci S, Faimali M, Piovetti L, Cimino G (1999) Antifouling from nature: Laboratory test with *balanus amphitrite* darwin on algae and sponges. In: Lewis JA (ed) 10th International Congress on Marine Corrosion and Fouling. DSTO Aeronautical and Maritime Research Laboratory, Victoria, Australia, University of Melbourne, pp 88
- Gévaert F, Créach A, Davoult D, Migné A, Levavasseur G, Arzel P, Holl A, Lemoine Y (2003) *Laminaria saccharina* photosynthesis measured in situ: photoinhibition and xanthophyll cycle during a tidal cycle. *Marine Ecology Progress Series* 247: 43-50
- Ghilarov A (1996) What does 'biodiversity' mean - scientific problem or convenient myth? *Trends in Ecology & Evolution* 11: 304-306
- Godoy E, Coutinho R (2002) Can artificial beds of plastic mimics compensate for seasonal absence of natural beds of *Sargassum furcatum*? *ICES Journal of Marine Science* 59: 111-115
- Guiry MD, Guiry GM (2009) *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>, searched on 13 October 2009
- Guzman S, Gato A, Calleja J (2001) Antiinflammatory, analgesic and free radical scavenging activities of the marine microalgae *Chlorella stigmatophora* and *Phaeodactylum tricornutum*. *Phytotherapy Research* 15

H

- Harada H, Kamei Y (1997) Selective cytotoxicity of marine algae extracts to several human leukemic cell lines. *Cytotechnology* 25: 213-219
- Harada H, Noro T, Kamei Y (1997) Selective antitumor activity in vitro from marine algae from Japan coasts. *Biological & pharmaceutical bulletin* 20: 541-546
- Hardy FG, Moss BL (1979) Notes on the attachment of zygotes and germlings of *Bifurcaria bifurcata* Ross (Phaeophyceae, Fucales). *Phycologia* 18 164-165
- Haugan JA, Englert G, Glinz E, Liaaen-Jensen S (1992) Structural assignments of geometrical isomers of fucoxanthin. *Acta Chemica Scandinavica* 46: 38395
- Hay ME (1996) Marine chemical ecology: what's known and what's next? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 200: 103-134
- Hayashi K, Mori J, Saito H, Hayashi T (2006) Antiviral targets of a chromene derivative from *Sargassum micracanthum* in the replication of human cytomegalovirus. *Biological & pharmaceutical bulletin* 29: 1843-1847
- Hellio C, Berge JP, Beauvil C, Le Gal Y, Bourgoignon N (2002) Screening of marine algal extracts for anti-settlement activities against microalgae and macroalgae. *Biofouling* 18: 205-215
- Hellio C, Bremer G, Pons AM, Le Gal Y, Bourgoignon N (2000) Inhibition of the development of microorganisms (bacteria and fungi) by extracts of marine algae from Brittany, France. *Applied Microbiology and Biotechnology* 54: 543-549
- Hellio C, Thomas-Guyon H, Culiolib G, Piovetti L, Bourgoignon N, Le Gal Y (2001) Marine antifoulants from *Bifurcaria bifurcata* (Phaeophyceae, Cystoseiraceae) and other brown macroalgae. *Biofouling*
- Hemmi A, Honkanen T, Jormalainen V (2004) Inducible resistance to herbivory in *Fucus vesiculosus*-duration, spreading and variation with nutrient availability. *marine ecology process series* 273: 109-120

- Hemmi A, Jormalainen V (2004) Geographic covariation of chemical quality of the host alga *Fucus vesiculosus* with fitness of the herbivorous isopod *Idotea baltica*, pp 759-768
- Hemmi A, Makinen A, Jormalainen V, Honkanen T (2005) Responses of growth and phlorotannins in *Fucus vesiculosus* to nutrient enrichment and herbivory. *Aquatic Ecology* 39: 201-211
- Henderson RJ, Tocher DR (1992) Thin-layer chromatography. In: Hamilton RJ, Hamilton S (eds) *Lipid Analysis. A Practical Approach*. IRL Press., Oxford, pp 65-111
- Henry BE, Van Alstyne KL (2004) Effects of UV radiations on growth and Phlorotannins in *Fucus gardneri* (Phaeophyceae) juveniles and embryos. *Journal of Phycology* 40: 527-533
- Heo S-J, Jeon Y-J (2009) Protective effect of fucoxanthin isolated from *Sargassum siliquastrum* on UV-B induced cell damage. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 95: 101-107
- Herrero R, Lodeiro P, Rey-Castro C, Vilarino T, Sastre de Vicente ME (2005) Removal of inorganic mercury from aqueous solutions by biomass of the marine macroalga *Cystoseira baccata*. *Water Research* 39: 3199-3210
- Hily C, Raffin C, Connan S (1999) Les herbiers de zostères en Bretagne. Inventaire des sites, faune et flore. Diren Bretagne : 57 p., pp
- Honkanen T, Jormalainen V (2005) Genotypic variation in tolerance and resistance to fouling in the brown alga *Fucus vesiculosus*. *Oecologia* 144: 196-205
- Honkanen T, Jormalainen V, Hemmi A, Mäkinen A, Heikkilä N (2002) Feeding and growth of the isopod *Idotea baltica* on the brown alga *Fucus vesiculosus*: roles of inter-population and within-plant variation in plant quality. *Ecoscience* 9: 332-338
- Hopkins WG (2003) *Physiologie Végétale*. De Boeck Université, Bruxelles, pp
- Horie S, Tsutsumi S, Takada Y, Kimura J (2009) Antibacterial Quinone Metabolites from the Brown Alga, *Sargassum sagamianum*. *ChemInform* 40
- Hoshino T, Hayashi T, Hayashi K, Hamada J, Lee J, Sankawa U (1998) An antivirally active sulfated polysaccharide from *Sargassum horneri*(Turner) C. AGARDH. *Biological & pharmaceutical bulletin* 21: 730-734
- Hosokawa M, Kudo M, Maeda H, Kohno H, Tanaka T, Miyashita K (2004) Fucoxanthin induces apoptosis and enhances the antiproliferative effect of the PPAR[gamma] ligand, troglitazone, on colon cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1675: 113-119
- Hougaard L, Anthoni U, Christophersen C, Nielsen PH (1991) Eleganolone derived diterpenes from *Bifurcaria bifurcata*. *Phytochemistry* 30: 3049-3051
- Huang D, Ou B, Prior RL (2005) The chemistry behind antioxidant capacity assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 1841-1856
- Hubbard DK (1997) Reefs as Dynamic Systems. In: Birkeland (ed) *Life and Death of Coral Reef*. Chapman et Hall, International Thomson Publishing, University of Guam, pp 536
- Hudson JB, Kim JH, Lee MK, DeWreede RE, Hong YK (1999) Antiviral compounds in extracts of Korean seaweeds: Evidence for multiple activities. *Journal of Applied Phycology* 10: 427-434
- Hughes TP (1994) Catastrophes, phase shifts, and large-scale degradation of a Caribbean coral reef. *Science* 265: 1547-1551

I

- Ioannou E, Roussis V (2009) Natural Products from Seaweeds. In: Osbourn AE, Lanzotti V (eds) *Plant-derived Natural Products: Synthesis, Function, and Application*. Springer, pp 51-82
- Ireland C, Horn M (1991) Effects of macrophyte secondary chemicals on food choice and digestive efficiency of *Cebidichthys violaceus*(Girard), and herbivorous fish of temperate marine waters. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 153: 179-194
- Iwashima M, Mori J, Ting X, Matsunaga T, Hayashi K, Shinoda D, Saito H, Sankawa U, Hayashi T (2005a) Antioxidant and antiviral activities of plastoquinones from the brown alga *Sargassum micracanthum*, and a new chromene derivative converted from the plastoquinones. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 28: 374-377
- Iwashima M, Mori J, Ting X, Matsunaga T, Hayashi K, Shinoda D, Saito H, Sankawa U, Hayashi T (2005b) Antioxidant and antiviral activities of plastoquinones from the brown alga *Sargassum micracanthum*, and a new chromene derivative converted from the plastoquinones. *Biological & pharmaceutical bulletin* 28: 374-377

J

- Jang KH, Lee BH, Choi BW, Lee H-S, Shin J (2005) Chromenes from the brown alga *Sargassum siliquastrum*. *Journal of Natural Products* 68: 716-723
- Jennings JG, Steinberg PD (1994) In situ exudation of phlorotannins by the sublittoral kelps *Ecklonia radiata*. *Marine Biology* 121: 349-354
- Jennings JG, Steinberg PD (1997) Phlorotannins versus other factors affecting epiphyte abundance on the kelp *Ecklonia radiata*. *Oecologia* 109: 461-473
- Jeon S, Woo M, Kim H, Do G, Shin Y, Choi M (2008) Antibiotic effects of seaweed ethanol extract containing fucoxanthin in the C57BL/6J mice. *Journal of Clinical Lipidology* 2: S117-S118
- Jimenez-Escrig A, Jimenez-Jimenez I, Pulido R, Saura-Calixto F (2001) Antioxidant activity of fresh and processed edible seaweeds. *Journal of Science of Food and Agriculture* 81: 530-534
- Jin D-Q, Lim CS, Sung J-Y, Choi HG, Ha I, Han J-S (2006) *Ulva conglobata*, a marine algae, has neuroprotective and anti-inflammatory effects in murine hippocampal and microglial cells. *Neuroscience Letters* 402: 154-158
- Johnson C, Mann K (1986) The importance of plant defence abilities to the structure of subtidal seaweed communities: The kelp *Laminaria longicirris* de la Pylaie survives grazing by the snail *Lacuna vincta* (Montagu) at high population densities. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 97: 231-267
- Jormalainen V, Honkanen T (2004) Variation in natural selection for growth and phlorotannins in the brown alga *Fucus vesiculosus*. *Journal of Evolutionary Biology* 17: 807-820
- Jormalainen V, Honkanen T, Koivikko R, Eranen J (2003) Induction of phlorotannin production in a brown alga: defense or resource dynamics? *OIKOS* 103: 640-650

K

- Kang JY, Khan MNA, Park NH, Cho JY, Lee MC, Fujii H, Hong YK (2008) Antipyretic, analgesic, and anti-inflammatory activities of the seaweed *Sargassum fulvellum* and *Sargassum thunbergii* in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 116: 187-190
- Karez C, Pereira R (1995) Metal contents in polyphenolic fractions extracted from the brown alga *Padina gymnospora*. *Botanica Marina* 38: 151-155
- Kaur C, Kapoor HC (2002) Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *International Journal of Food Science & Technology* 37: 153-161
- Keeling PJ, Burger G, Durnford DG, Lang BF, Lee RW, Pearlman RE, Roger AJ, Gray MW (2005) The tree of Eukaryotes. *Trends in Ecology and Evolution* 20: 670-676
- Kendrick GA, Brearley A (1997) Influence of *Sargassum* spp. to rhodolith on sampling effort and demographic analysis of *Sargassum* spp. (Sargassaceae, Phaeophyta) attached to reefs. *Botanica Marina* 40: 517-521
- Kesava Rao C, Untawale AG (1991) Polyphenols content of Indian seaweeds. *Mahasagar* 24: 99-102
- Khotimchenko S (1991) Fatty acid composition of seven *Sargassum* species. *Phytochemistry* 30: 2639-2641
- Kilar JA, D. HM, Yoshida T (1992) On the expression of phenotypic variability: why is *Sargassum* so taxonomically difficult? In: Abbott IA (ed) *Taxonomy of economic seaweeds* (Vol 3). California Sea Grant College Program, La Jolla, pp 95-117
- Kim J, Yoon M, Cha M, Hwang J, Park E, Choi S, Park H, Hwang Y (2007) Methanolic Extracts of *Plocamium telfairiae* Induce Cytotoxicity and Caspase-Dependent Apoptosis in HT-29 Human Colon Carcinoma Cells. *Journal of medicinal food* 10: 587-593
- Kim Y, Choi J-S, Hong J, Yoo J, Kim M (1999) Identification of acylated glycolipids from a cyanobacterium, *Synechocystis* sp., by tandem mass spectrometry. *Lipids* 34: 847-853
- Koehl MAR, Jumars PA, Karp-Boss L (2003) Algal Biophysics. In: Norton TA (ed) *Out of the Past: Collected Reviews to Celebrate the Jubilee of the British Phycological society*. The British Phycological Society, Belfast, pp 115-130
- Koivikko R, Eränen J, Lopenen J, Jormalainen V (2008) Variation of phlorotannins among three populations of *Fucus vesiculosus* as revealed by HPLC and colorimetric quantification. *Journal of Chemical Ecology* 34: 57-64
- Koleva II, Van Beek TA, Linssen JPH, De Groot A, Evstatieva LN (2002) Screening of Plant Extracts for Antioxidant Activity: a Comparative Study on Three Testing Methods. *Phytochemical Analysis* 13: 8-17

- Koo J, Choi Y, Kwak J (2001) Blood-Anticoagulant Activity of Fucoidans from Sporophylls of *Undaria pinnatifida*, *Laminaria religiosa*, *Hizikia fusiforme* and *Sargassum fulvellum* in Korea. *Journal -Korean Fisheries Society* 34: 515-520
- Kornprobst J-M (2005) Substances naturelles d'origine marine : Chimiodiversité - Pharmacodiversité - Biotechnologie. Tec & Doc Lavoisier, Paris, pp 1830
- Kornprobst J-M (2006) Phaeophyceae (Algues Brunes). In: TEC&DOC (ed) Substances naturelles d'origine marine Chimiodiversité - Pharmacodiversité - Biotechnologies Tome 1 : Généralités - Micro-organismes - Algues. Lavoisier, Londres - Paris - New York, pp 419 - 499
- Kubaneck J, Lester SE, Fenical W, Hay ME (2004) Ambiguous role of phlorotannins as chemical defenses in the brown alga *Fucus vesiculosus*. *Marine Ecology Progress Series* 277: 79-93

L

- Laboute P, Richer de Forges B (2004) Lagons et Récifs de Nouvelle-Calédonie. Edition Catherine Ledru, IRD, Nouméa, pp 520
- Landreau A, Pouchus YF, Sallenave-Namont C, Biard J-F, Boumard M-C, Robiou du Pont T, Mondegue F, Goulard C, Verbist J-F (2002) Combined use of LC/MS and a biological test for rapid identification of marine mycotoxins produced by *Trichoderma koningii*. *Journal of Microbiological Methods* 48: 181-194
- Lane AL, Kubaneck J (2008) Secondary metabolites defences against pathogens and biofoulers. In: Amsler CD (ed) *Algal Chemical Ecology*. Springer, Verlag Berlin Heidelberg, pp 229-243
- Langlois GA (1975) Effect of algal exudates on substratum selection by motile telotrochs of the marine peritrich ciliate *Vorticella marina*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 22: 115-123
- Lasne G (2007) Les coraux de la Nouvelle-Calédonie: synthèse bibliographique. CRISP, pp 93
- Lau S, Qian P (1997) Phlorotannins and related compounds as arval settlement inhibitors of the tube-building polychaete *Hydroides elegans*. *Marine Ecology Progress Series* 159: 219-227
- Lau S, Qian P (2000) Inhibitory effect of phenolic compounds and marine bacteria on larval settlement of the barnacle *Balanus amphitrite* Darwin. *Biofouling* 16: 47-58
- Le Corre P, Birrien J (1985) Conditions de formation des eaux colorées à *Gyrodinium aureolum* : Cas de la Baie de Douarnenez. Rapport UBO, Contrat Ifremer 84/3178 : 61p., pp 61
- Le Lann K (2006) Connaissance chimiotaxonomique du genre *Turbinaria* et Etude des composés de défense de différentes espèces de Sargassacées des îles Salomon (Pacifique Sud). Rapport de stage de Master 2, Sciences de la Mer et du Littoral, mention Sciences Biologiques Marines, IUEM - UBO, Plouzané, pp 30
- Le Lann K, Jégou C, Stiger-Pouvreau V (2008a) Effect of different conditioning treatments on total phenolic content and antioxidant activities in two Sargassacean species: Comparison of the frondose *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt and the cylindrical *Bifurcaria bifurcata* R. Ross. *Phycological Research* 56: 238-245
- Le Lann K, Kervarec N, Payri CE, Deslandes E, Stiger-Pouvreau V (2008b) Discrimination of allied species within the genus *Turbinaria* (Fucales, Phaeophyceae) using HRMAS NMR spectroscopy. *Talanta* 74: 1079-1083
- Le Lann K, Ferret C, Lhuillery M, Payri C, Stiger-Pouvreau V (in review) Total phenolic contents and associated antioxidative activities in tropical Sargassaceae species (Fucales, Phaeophyceae) from the South Pacific Ocean: variability induced by biotic and abiotic factors. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* (JEMBE -D-09-00381)
- Le Lann K, Stiger-Pouvreau V (in review) Comparison of spatio-temporal phenologies of introduced and native Sargassaceae species living in coexistence along the coast of Western Brittany. *Marine Biology* (MABI-D-09-00463)
- Le Lann K, Bourguet-Kondracki M, Longeon A, Ioannou E, Roussis V, Payri C, Stiger-Pouvreau V (à soumettre) Potent anti-inflammatory active compounds isolated from marine brown algae (Sargassaceae, Fucales) collected in the Solomon Islands, South Pacific. *Pharmacological Research*
- Le Lann K, Kervarec N, Cerantola S, Ioannou E, Roussis V, Kraffe E, Payri C, Stiger-Pouvreau V (à soumettre) Identification of turbinaric acid in the brown alga *Turbinaria conoides* (J. Agardh) Kützinger from South Pacific islands and its chemotaxonomic significance. *Biochemical Systematics and Ecology*
- Le Tutour B, Benslimane F, Gouleau MP, Gouygou JP, Saadan B, Quemeneur F (1998) Antioxidant and prooxidant activities of the brown algae, *Laminaria digitata*, *Himanthalia elongata*, *Fucus vesiculosus*, *Fucus serratus* and *Ascophyllum nodosum*. *Journal of Applied Phycology* 10: 121-129

- Ledón N, Casacó A, Remirez D, González A, Cruz J, González R, Capote A, Tolón Z, Rojas E, Rodríguez V (2007) Effects of a mixture of fatty acids from sugar cane (*Saccharum officinarum* L.) wax oil in two models of inflammation: Zymosan-induced arthritis and mice tail test of psoriasis. *Phytomedicine* 14: 690-695
- Ledón N, Casaco A, Rodriguez V, Cruz J, Gonzalez R, Tolon Z, Cano M, Rojas E (2003) Anti-inflammatory and analgesic effects of a mixture of fatty acids isolated and purified from sugar cane wax oil. *Planta medica* 69: 367-369
- Ledón N, Romay C, Rodriguez V, Cruz J, Rodriguez S, Ancheta O, Gonzalez A, Gonzalez R, Tolon Z, Cano M (2005) Further studies on a mixture of fatty acids from sugar cane (*Saccharum officinarum*) wax oil in animal models of hypersensitivity. *Planta med* 71: 126-129
- Lee RE (1999) *Phycology*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 614
- Levin PS, Coyer JA, Petrik R, Good TP (2002) Community-wide effects of nonindigenous species on temperate rocky reefs. *Ecology* 83: 3182-3193
- Li X, Fan X, Han L, Lou Q (2002) Fatty acids of some algae from the Bohai Sea. *Phytochemistry* 59: 157-161
- Lim SN, Cheung PCK, Ooi VEC, Ang PO (2002) Evaluation of Antioxidative Activity of Extracts from a Brown Seaweed, *Sargassum siliquastrum*. *J. Agric. Food Chem.* 50: 3862-3866
- Lim YY, Murtijaya J (2007) Antioxidant properties of *Phyllanthus amarus* extracts as affected by different drying methods. *LWT - Food Science and Technology* 40: 1664-1669
- Little C, Kitching J (1996) *The biology of the rocky shores*. Oxford University Press, Oxford, pp 240
- Littler MM, Littler DS (1994) Essay: Tropical reefs as complex habitats for diverse macroalgae. In: Lobban CS, Harrison PG (eds) *Seaweed Ecology and Physiology*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 366
- Lobban CS, Harrison PG (1994) *Seaweed Ecology and Physiology*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 366
- Lobo de Araújo A, Radvanyi F (1987) Determination of phospholipase A2 activity by a colorimetric assay using a pH indicator. *Toxicon* 25: 1181-1188
- Lodeiro P, Barriada JL, Herrero R, Sastre de Vicente ME (2006) The marine macroalga *Cystoseira baccata* as bisorbent for cadmium (II) and lead (II) removal: Kinetic and equilibrium studies. *Environmental Pollution* 142: 264-273
- Lorraine I (1989) L'algue japonaise *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt : Caractéristiques et répartition. IFREMER, pp 51
- Lüder U, Clayton M (2004) Induction of phlorotannins in the brown macroalga *Ecklonia radiata* (Laminariales, Phaeophyta) in response to simulated herbivory—the first microscopic study. *Planta* 218: 928-937
- Lüning K (1990) *Seaweeds, their environment, biogeography, and ecophysiology*. John Wiley & Sons, Inc., New York, pp 527

M

- Maeda H, Hosokawa M, Sashima T, Miyashita K (2007) Dietary combination of fucoxanthin and fish oil attenuates the weight gain of white adipose tissue and decreases blood glucose in obese/diabetic KK-Ay mice. *J. of Agricultural and Food Chemistry* 55: 7701-7706
- Mahasneh I, Jamal M, Kashashneh M, Zibdeh M (1995) Antibiotic activity of marine algae against multi-antibiotic resistant bacteria. *Microbios* 83: 23-26
- Mantyka C, Bellwood D (2007) Direct evaluation of macroalgal removal by herbivorous coral reef fishes. *Coral Reefs* 26: 435-442
- Marco G (1968) A rapid method for evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 45: 594-598
- Maréchal J-P, Culiolib G, Hellio C, Thomas-Guyonc H, Callowd ME, Clarea AS, Ortalo-Magné A (2004) Seasonal variation in antifouling activity of crude extracts of the brown alga *Bifurcaria bifurcata* (Cystoseiraceae) against cyprids of *Balanus amphitrite* and the marine bacteria *Cobetia marina* and *Pseudoalteromonas haloplanktis*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 313: 47-62
- Maroon JC, Bost JW (2006) [omega]-3 Fatty acids (fish oil) as an anti-inflammatory: an alternative to nonsteroidal anti-inflammatory drugs for discogenic pain. *Surgical Neurology* 65: 326-331
- Matanjun P, Mohamed S, Mustapha N, Muhammad K, Ming C (2008) Antioxidant activities and phenolics content of eight species of seaweeds from north Borneo. *Journal of Applied Phycology* 20: 367-373

- Matsukawa R, Dubinsky Z, Kishimoto E, Masaki K, MaSuda Y, Takeushi T, Chihara M, Yamamoto Y, Niki E, Karube I (1997) A comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds. *Journal of Applied Phycology* 9: 29-35
- Mattio L (2008) Taxonomie du genre *Sargassum* (Fucales, Phaeophyceae) en Nouvelle-Calédonie et dans le Pacifique Sud. Approches morphologique et phylogénétique. Sciences de l'environnement marin, Marseille, pp 302
- Mayer A (1999) Marine pharmacology in 1998: antitumor and cytotoxic compounds. *The Pharmacologist* 41: 159-164
- Mayer A, Hamann M (2004) Marine pharmacology in 2000: marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antituberculosis, and antiviral activities, affecting the cardiovascular, immune, and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action. *Marine Biotechnology* 6: 37-52
- Mayer AMS, Hamann MT (2002) Marine pharmacology in 1999: compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anthelmintic, anti-inflammatory, antiplatelet, antiprotozoal and antiviral activities affecting the cardiovascular, endocrine, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 132: 315-339
- Mayer AMS, Hamann MT (2005) Marine pharmacology in 2001–2002: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities, affecting the cardiovascular, immune and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action. *Comparative Biochemistry and Physiology* 140: 265-286
- Mayer AMS, Paul VJ, Fenical W, Norris JN, Carvalho MS, Jacobs RS (1993) Phospholipase A2 inhibitors from marine algae. *Hydrobiologia* 260-261: 521-529
- Mayer AMS, Rodriguez AD, Berlinck RGS, Hamann MT (2007) Marine pharmacology in 2003-4: Marine compounds with anthelmintic antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities, affecting the cardiovascular, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 145: 553-581
- Mayer AMS, Rodriguez AD, Berlinck RGS, Hamann MT (2009) Marine pharmacology in 2005-6: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities, affecting the cardiovascular, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1790: 283-308
- McCourt RM (1984) Seasonal patterns of abundance, distributions and phenology in relation to growth strategies of three *Sargassum* species. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 74: 141-156
- McHugh D (2003) A guide to the seaweed industry. FAO Fisheries Technical Paper (FAO)
- McNair J (1929) The taxonomic and climatic distribution of oils, fats, and waxes in plants. *American Journal of Botany*: 832-841
- McNair J (1930) The Taxonomic and Climatic Distribution of Oil and Strach in Seeds in Relation to the Physical and Chemical Properties of Both Substances. *American Journal of Botany*: 662-668
- McNair J (1934) The evolutionary status of plant families in relation to some chemical properties. *American Journal of Botany*: 427-452
- McNair J (1935) Angiosperm phylogeny on a chemical basis. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*: 515-532
- Mineur F, Johnson M, Maggs C (2008) Macroalgal Introductions by Hull Fouling on Recreational Vessels: Seaweeds and Sailors. *Environmental Management* 42: 667-676
- Mokrini R, Mesaoud M, Daoudi M, Hellio C, Marechal J, El Hattab M, Ortalo-Magne A, Piovetti L, Culioli G (2008) Meroditerpenoids and Derivatives from the Brown Alga *Cystoseira baccata* and Their Antifouling Properties. *Journal of Natural Products* 71: 1806-1811
- Montaggioni LF (2005) History of Indo-Pacific coral reef systems since the last glaciation: Development patterns and controlling factors. *Earth-Science Reviews* 71: 1-75
- Monteiro C, Engelen AH, Serrão EA, Santos R (2009) Habitat differences in the timing of reproduction of the invasive alga *Sargassum muticum* (Phaeophyta, Sargassaceae) over tidal and lunar cycles. *Journal of Phycology*
- Moreau D, Thomas-Guyon H, Jacquot C, Juge M, Culioli G, Ortalo-Magne A, Piovetti L, Roussakis C (2006a) An extract from the brown alga *Bifurcaria bifurcata* induces irreversible arrest of cell proliferation in a non-small-cell bronchopulmonary carcinoma line. *Journal of applied Phycology* 18 %6: 97-93 %&

- Moreau D, Thomas-Guyon H, Jacquot C, Jugé M, Culioli G, Ortalo-Magné A, Piovetti L, Roussakis C (2006b) An extract from the brown alga *Bifurcaria bifurcata* induces irreversible arrest of cell proliferation in a non-small-cell bronchopulmonary carcinoma line. *Journal of Applied Phycology* 18: 87-93
- Moret V, Laras Y, Cresteil T, Aubert G, Ping DQ, Di C, Barthélémy-Requin M, Béclin C, Peyrot V, Allegro D, Rolland A, De Angelis F, Gatti E, Pierre P, Pasquini L, Petrucci E, Testa U, Kraus J-L (2009) Discovery of a new family of bis-8-hydroxyquinoline substituted benzylamines with pro-apoptotic activity in cancer cells: Synthesis, structure-activity relationship, and action mechanism studies. *European Journal of Medicinal Chemistry* 44: 558-567
- Mori J, Matsunaga T, Takahashi S, Hasegawa C, Saito H (2003) Inhibitory Activity on Lipid Peroxidation of Extracts from Marine Brown Alga. *Phytotherapy Research* 17: 549-551
- Mori K, Ooi T, Hiraoka M, Oka N, Hamada H, Tamura M, Kusumi T (2004) Fucoxanthin and its metabolites in edible brown algae cultivated in deep seawater. *Marine Drugs* 2: 63-72
- Morin P, Connan S, Le Corre P (1994) Fronts thermiques de marée: cas des fronts de la Manche Occidentale et de la Mer Celtique. *Océanis* 20: 21-43
- Mueller-Harvey I (2001) Analysis of hydrolysable tannins. *Animal Feed Science and Technology* 91: 3-20

N

- Nakai M, Kagayama N, Nakahara K, Miki W (2006) Phlorotannins as radical scavengers from the extract of *Sargassum ringgoldianum*. *Marine Biotechnology* 8: 409-414
- Nakamura T, Nagayama K, Uchida K, Tanaka R (1996) Antioxidant activity of phlorotannins isolated from the brown alga *Eisenia bicyclis*. *Fisheries Science* 62: 923-926
- Nakazawa Y, Sashima T, Hosokawa M, Miyashita K (2009) Comparative evaluation of growth inhibitory effect of stereoisomers of fucoxanthin in human cancer cell lines. *Journal of Functional Foods* 1: 88-97
- Natarajan S (2009) Cholinesterase inhibitors from *Sargassum* and *Gracilaria gracilis*: Seaweeds inhabiting South Indian coastal areas (Hare Island, Gulf of Mannar). *Natural Product Research* 23: 355-369
- Nomura T, Kikuchi M, Kubodera A, Kawakami Y (1997) Proton-donative antioxidant activity of fucoxanthin with 1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl (DPPH). *IUBMB Life* 42: 361 - 370
- Numata A, Kanbara S, Takahashi C, Fujiki R, Yoneda M, Fujita E, Nabeshima Y (1991) Cytotoxic activity of marine algae and a cytotoxic principle of a brown alga *Sargassum tortile*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 39: 21229-22131
- Numata A, Kanbara S, Takahashi C, Fujiki R, Yoneda M, Usami Y, Fujita E (1992) A cytotoxic principle of the brown alga *Sargassum tortile* and structures of chromenes. *Phytochemistry* 31: 1209-1213

O

- Olabarria C, Rodil IF, Incera M, Troncoso JS (2009) Limited impact of *Sargassum muticum* on native algal assemblages from rocky intertidal shores. *Marine Environmental Research* 67: 153-158
- Ortalo-Magné A, Culioli G, Valls R, Pucci B, Piovetti L (2005) Polar acyclic diterpenoids from *Bifurcaria bifurcata* (Fuciales, Phaeophyta). *Phytochemistry* 66: 2316-2323

P

- Parent-Massin D, Deslandes E, Payri C (1998) Effects on hematopoietic progenitors of 15 extracts from marine macroalgae: *Turbinaria ornata* and *Sargassum mangroveense*. *Toxicology letters* Toleds 5/95: 19-27
- Park J, Choi J, Song S, Choi M, Kim K, Choi J (1997) Hepatoprotective effect of extracts and phenolic compound from marine algae in bromobenzene-treated rats. *Korean Journal of Pharmacognosy (Korea Republic)*
- Patra J, Rath S, Jena K, Rathod V, Thatoi H (2008) Evaluation of antioxidant and antimicrobial activity of seaweed (*Sargassum* sp.) extract: A study on inhibition of glutathione-S-transferase Activity. *Turkish Journal of Biology* 32: 119-125p
- Paul VJ, Puglisi MP (2004) Chemical mediation of interactions among marine organisms. *Natural Product Reports* 21: 189-209
- Pavia H, Åberg P (1996) Spatial variation in polyphenolic content of *Ascophyllum nodosum* (Fuciales, Phaeophyta). *Hydrobiologia* 326: 199-203

- Pavia H, Brock E (2000) Extrinsic factors influencing phlorotannin production in the brown alga *Ascophyllum nodosum*. Marine Ecology Process Series 193: 285-294
- Pavia H, Cervin G, Lingren A, Åberg P (1997) Effects of UV-B radiation and simulated herbivory on phlorotannins in the brown alga *Ascophyllum nodosum*. marine ecology process series 157: 139-146
- Pavia H, Toth G (2000a) Inducible chemical resistance to herbivory in the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*. Ecology 81: 3212-3225
- Pavia H, Toth G (2000b) Influence of light and nitrogen on the phlorotannin content of the brown seaweed *Ascophyllum nodosum* and *Fucus vesiculosus*. Hydrobiologia 440: 299-305
- Pavia H, Toth G, Åberg P (2002) Optimal defense theory: elasticity analysis as a tool to predict intraplant variation in defenses. Ecology 83: 891-897
- Pavia H, Toth G, Lindgren A, Åberg P (2003) Intraspecific variation in the phlorotannin content of the brown alga *Ascophyllum nodosum*. Phycologia 42: 378-383
- Paya M, Ferrandiz M, Sanz M, Bustos G, Blasco R, Rios J, Alcaraz M (1993) Study of the antioedema activity of some seaweed and sponge extracts from the mediterranean coast in mice. Phytotherapy Research 7
- Payri C (1984) Variations biologiques et morphologiques en fonction du milieu chez *Turbinaria ornata* (Turner) J. Agardh (Phéophycées) du récif de Tiahura - Ile de Moorea - Polynésie Française. Botanica Marina 27: 327-333
- Peckol P, Krane JM, Yates JL (1996) Interactive effects of inducible defense and resource availability on phlorotannins in the North Atlantic brown alga *Fucus vesiculosus*. marine ecology process series 138: 209-217
- Pereira RC, Yoneshigue-Valentin Y (1999) The role of polyphenols from the tropical brown alga *Sargassum furcatum* on the feeding by amphipod herbivores. Botanica Marina 42: 441-448
- Phillips N (1995) Biogeography of *Sargassum* (Phaeophyta) in the Pacific basin. . In: Abbott IA (ed) Taxonomy of economic seaweeds California Sea Grant College Program, La Jolla, pp 107-144.
- Phillips N, Burrowes R, Rousseau F, de Reviere B, Saunders GW (2008a) Resolving evolutionary relationships among the brown algae using chloroplast and nuclear genes. Journal of Phycology 44: 394-405
- Phillips N, Calhoun S, Moustafa A, Bhattacharya D, Braun E (2008b) Genomic insights into evolutionary relationships among Heterokont lineages emphasizing the Phaeophyceae 1. Journal of Phycology 44: 15-18
- Pietra F, Baldwin JE, Williams RM (2002) Biodiversity and Natural Product Diversity. Tetrahedron Organic Chemistry Series, Vol. 21, Elsevier Sciences Ltd. , Oxford, pp 366
- Plante R, Le Loeuff P (1983) Le benthos marin et les stratégies d'échantillonnage. In: Frontier S (ed) Stratégies d'échantillonnage en écologie. Masson, Paris, pp 325-340
- Plouguerné E (2006) Étude écologique et chimique de deux algues introduites sur les côtes bretonnes, *Grateloupia turuturu* Yamada et *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt : nouvelles ressources biologiques de composés à activité antifouling. Chimie Marine, Brest, pp 251
- Plouguerné E, Hellio C, Deslandes E, Véron B, Stiger-Pouvreau V (2008) Anti-microfouling activities in extracts of two invasive algae: *Grateloupia turuturu* and *Sargassum muticum*. Botanica Marina 51: 202-208
- Plouguerné E, Ioannou E, Georgantea P, Vagias C, Roussis V, Hellio C, Kraffe E, Stiger-Pouvreau V (2009) Anti-microfouling activity of lipidic metabolites from the invasive brown alga *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt. Marine Biotechnology: 1-10
- Plouguerné E, Le Lann K, Connan S, Jechoux G, Deslandes E, Stiger-Pouvreau V (2006) Spatial and seasonal variation in density, reproductive status, length and phenolic content of the invasive brown macroalga *Sargassum muticum* (Tendo) Fensholt along the coast of Western Brittany (France). Aquatic Botany 85: 337-334
- Poore A (1994) Selective herbivory by amphipods inhabiting the brown alga *Zonaria angustata*. Marine Ecology-Progress Series 107: 113-113
- Potin P, Bouarab K, Salaün J-P, Pohnert G, Kloareg B (2002) Biotic interactions of marine algae. Current Opinion in Plant Biology 5: 308-317
- Potin P, Leblanc C (2006) Phenolic-based Adhesives of Marine Brown Algae Biological Adhesives, pp 105-124
- Potts B, Faulkner D, Jacobs R (1992) Phospholipase A2 inhibitors from marine organisms. Journal of Natural Products 55: 1701-1717
- Prabhakar KR, Veerapur VP, Bansal P, Vipin KP, Reddy KM, Barik A, Reddy BKD, Reddanna P, Priyadarsini KI, Unnikrishnan MK (2006) Identification and evaluation of antioxidant, analgesic/anti-inflammatory activity of the most active ninhydrin-phenol adducts synthesized. Bioorganic & Medicinal Chemistry 14: 7113-7120
- Preeprame S, Hayashi K, Lee J, Sankawa U, Hayashi T (2001) A novel antivirally active fucan sulfate derived from an edible brown alga, *Sargassum horneri*. Chemical & pharmaceutical bulletin 49: 484-485

Prud'homme van Reine WF (2002) *Sargassum* C. Agardh. . In: Prud'homme van Reine WFT, G. C. (ed) Plant resources of South-East Asia No. 15(1). Cryptogams: Algae. Prosea Foundation, Bogor, pp 240-246

R

- Ragan M, Smidsrod O, Larsen B (1979) Chelation of divalent metal ions by brown algal polyphenols. *Marine Chemistry* 7
- Ragan MA, Glombitza K-W (1986) Phlorotannins, brown algal polyphenols. *Progress in Phycological Research* 4: 129-241
- Ragan MA, Jensen A (1978) Quantitative studies on brown algal phenols. II. Seasonal variation in polyphenol content of *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol. and *Fucus vesiculosus* (L.). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 34: 245–258
- Rao P (1996) Biological investigations of Indian phaeophyceae. 15, effect of antibacterial substance extracted from *Sargassum johnstonii* Setchell et Gardner collected from Okha, west coast of India on the growth of bacteria
- Rastian Z, Mehranian M, Vahabzadeh F, Sartavi K (2007) Antioxidant Activity of Brown Algae *Sargassum vulgar* and *Sargassum angustifolium*. *Journal of Aquatic Food Product Technology* 16: 17-26
- Retz de Carvalho L, Franca Roque N (2004) Correlations between primary and secondary metabolites in Ceramiales (Rhodophyta). *Biochemical Systematics and Ecology* 32: 337-342
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1997) Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in plant science* 2: 152-159
- Rindi F, Guiry MD (2004) A long-term compoaraision of the benthic algal flora of Clare Island, County Mayi, western Ireland. *Biodiversity and Conservation* 13: 471-492
- Roberto G, Baratta MT, Biondi DM, Amico V (2001) Antioxidant activity of extracts of the marine algal genus *Cystoseira* in a micellar model system. *Journal Applied of Phycology* 13: 403-407
- Rohfritsch A (2006) Approches phylogéniques et phylogéographique du genre *Turbinaria* (Phaeophyceae). Contribution à l'étude de la structure génétique des populations de *Turbinaria ornata* en Polynésie française. *Sciences de l'environnement marin*, pp 242
- Rohfritsch A, Payri C, Stiger V, Bonhomme F (2007) Molecular and morphological relationships between two closely related species, *Turbinaria ornata* and *T. conoides* (Sargassaceae, Phaeophyceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 35: 91-98
- Rossier O, Kulbicki M (2000) A comparison of fish assemblages from two types of algal beds and coral reefs in the south-west lagoon of New Caledonia. *Cybiurn* 24: 3-26
- Rousseau F, De Reviers B (1999) Phylogenetic relationships within the fucales (Phaeophyceae) based on combined partial SSU + LSU rDNA sequence data. *European Journal of Phycology* 34: 53-64
- Rousseau F, Leclerc MC, De Reviers B (1997) Molecular phylogeny of European Fucales (Phaeophyceae) based on partial large-subunit rDNA sequence comparisons. *Phycologia* 36: 438-446
- Rozas E, Freitas J (2008) Neurotoxins in the polar fraction of the seaweed *Galaxaura marginata* (Rhodophyta, Nemaliales). *Revista Brasileira de Farmacognosia* 18: 160-164

S

- Sachindra N, Sato E, Maeda H, Hosokawa M, Niwano Y, Kohno M, Miyashita K (2007) Radical scavenging and singlet oxygen quenching activity of marine carotenoid fucoxanthin and its metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 8516-8522
- Sampath-Wiley P, Neefus CD, Jahnke LS (2008) Seasonal effects of sun exposure and emersion on intertidal seaweed physiology: Fluctuations in antioxidant contents, photosynthetic pigments and photosynthetic efficiency in the red alga *Porphyra umbilicalis* Kützting (Rhodophyta, Bangiales). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 361: 83-91
- Sanchez-Machado DI, Lopez-Cervantes J, Lopez-Hernandez J, Paseiro-Losada P (2004) Fatty acids, total lipid, protein and ash contents of processed edible seaweeds. *Food Chemistry* 85: 439-444
- Sanchez I, Fernandez C (2006) Resource availability and invasibility in an intertidal macroalgal assemblage. *Marine Ecology Progress Series* 313: 85-94
- Sanchez I, Fernandez C, Arrontes J (2005) Long-term changes in the structure of intertidal assemblages after invasion by *Sargassum muticum* (Phaeophyta). *J. Phycol.* 41: 942-949

- Sanoner P, Guyot S, Marnet N, Molle D, Drilleau J-F (1999) Polyphenol Profiles of French Cider Apple Varieties (*Malus domestica* sp.). *J. Agric. Food Chem.* 47: 4847-4853
- Santos MGM, Lagrota MHC, Miranda MMFS, Yoneshigue-Valentin Y, Wigg MD (1999) A screening for antiviral effect of extracts from Brazilian marine algae against Acyclovir resistant Herpes simplex virus type 1. *Botanica Marina* 42: 227-230
- Santoso J, Yoshie-Stark Y, Suzuki T (2004) Anti-oxidant activity of methanol extracts from Indonesian seaweeds in an oil emulsion model. *Fisheries science* 70: 183-188
- Sawai Y, Fujita Y, Sakata K, Tamashiro E (1994) 20-hydroxy-4,8,13,17-tetramethyl-4,8,12,16-eicosatetraenoic acid, a new feeding deterrent against herbivorous gastropods, from the subtropical brown alga *Turbinaria ornata*. *Fisheries science* 60: 199-201
- Schoenwaelder MEA (2002) The occurrence and cellular significance of physodes in brown algae. *Phycologia* 41: 125-139
- Schoenwaelder MEA, Clayton MN (1999a) The presence of phenolic compounds in isolated cell walls of brown algae. *Phycologia* 38: 161-166
- Schoenwaelder MEA, Clayton MN (1999b) The role of the cytoskeleton in brown algal physode movement. *European Journal of Phycology* 34: 223-229
- Schofield O, Evens T, Millie D (1998) Photosystem II quantum yields and xanthophyll-cycle pigments of the macroalga *Sargassum natans* (Phaeophyceae): responses under natural sunlight. *Journal of Phycology* 34: 104-112
- Schoth M, Tesch F (1982) Spatial distribution of 0-group eel larvae (*Anguilla* sp.) in the Sargasso Sea. *Helgoland Marine Research* 35: 309-320
- Semmak L, Zerzouf A, Valls R, Banaigs B, Jeanty G, Francisco C (1988) Acyclic diterpenes from *Bifurcaria bifurcata*. *Phytochemistry* 27: 2347-2349
- Seo Y, Lee H-J, Park KE, Kim YA, Ahn J-W, Yoo J-S, Lee B-J (2004) Peroxynitrite-scavenging constituents from the brown alga *Sargassum thunbergii*. *Biotechnology and Bioengineering* 9: 212-216
- Sharma O (1993) Plant taxonomy. Tara McGraw - Hill Publishing Company limited, New Delhi, pp 482
- Sharma S, Upadhyay A, Haque M, Raghavendra K, Dash A (2008) Field evaluation of a previously untested strain of biolarvicide (*Bacillus thuringiensis israelensis* H14) for mosquito control in an urban area of Orissa, India. *Journal of the American Mosquito Control Association* 24: 410-414
- Sheu J-H, Wang G-H, Sung P-J, Chiu Y-H, Duh C-Y (1997) Cytotoxic sterols from formosan brown alga *Turbinaria ornata*. *Planta Medica* 63: 571-572
- Sheu J-H, Wang G-H, Sung P-J, Duh C-Y (1999) New Cytotoxic Oxygenated Fucosterols from the Brown Alga *Turbinaria conoides*. *J. Nat. Prod.* 62: 224-227
- Shick JM, Lesser MP, Jokiel PL (1996) Effects of ultraviolet radiation on corals and other coral reef organisms. *Global Change Biology* 2: 527-545
- Sieburth J, Conover J (1965) *Sargassum* tannin, an antibiotic which retards fouling
- Singh IP, Bharate SB (2006) Phloroglucinol compounds of natural origin. *Natural Product Reports* 23: 558-591
- Smit AJ (2004) Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: A review. *Journal of Applied Phycology* 16: 245-262
- Soobrattee MA, Bahorun T, Neergheen VS, Googoolye K, Aruoma OI (2008) Assessment of the content of phenolics and antioxidant actions of the Rubiaceae, Ebenaceae, Celastraceae, Erythroxylaceae and Sterculaceae families of Mauritian endemic plants. *Toxicology in Vitro* 22: 45-56
- Sreenivasa Rao PP, Sreenivasa Rao P, Karmarkar SM (1986) Antibacterial Substances from Brown Algae. Efficiency of Solvents in the Evaluation of Antibacterial Substances from *Sargassum johnstonii* Setchell et Gardner. *Botanica Marina* XXIX: 503-507
- Sreenivasa Rao PP, Sreenivasa Rao P, Karmarkar SM (1988) Antibacterial activity from Indian Species of *Sargassum*. *Botanica Marina* 31: 295-298
- Stæhr P, A. , Morten FP, Mads ST, Thomas W, Dorte K-J (2000) Invasion of *Sargassum muticum* in Limfjorden (Denmark) and its possible impact on the indigenous macroalgal community. *Marine Ecology Progress Series* 207 79-88
- Steinberg P (1985) Feeding preferences of *Tegula funebris* and chemical defenses of marine brown algae. *Ecological Monographs* 333-349
- Steinberg P (1988) Effects of quantitative and qualitative variation in phenolic compounds on feeding in three species of marine invertebrate herbivores. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 120: 221-237

- Steinberg P (1989) Biogeographical variation in brown algal polyphenolics and other secondary metabolites: comparison between temperate Australasia and North America. *Oecologia* 78: 373-382
- Steinberg P, van Altena I (1992) Tolerance of marine invertebrate herbivores to brown algal phlorotannins in temperate Australasia. *Ecological Monographs*: 189-222
- Steinberg PD (1984) Algal chemical defense against herbivores: allocation of phenolic compounds in the Kelp *Alaria marginata*. *Science* 223: 405-407
- Steinberg PD (1986) Chemical defenses and the susceptibility of tropical marine brown algae to herbivores. *Oecologia* 69: 628-630
- Steinberg PD (1994) Lack of short-term induction of phlorotannins in the Australian brown algae *Ecklonia radiata* and *Sargassum vestitum*. *marine ecology process series* 112: 129-133
- Steinberg PD, Edyvane K, De Nys R, Birdsey R, Van Altena IA (1991) Lack of avoidance of phenolic-rich brown algae by treropical herbivorous fishes. *Marine Biology* 109: 335-343
- Steinberg PD, Paul VJ (1990) Fish feeding and chemical defenses of tropical brown algae in Western Australia. *Marine Ecology Progress Series* 58: 253-259
- Stern J, Hagerman A, Steinberg P, Mason P (1996) Phlorotannin-protein interactions. *Journal of Chemical Ecology* 22: 1877-1899
- Stewart HL (2004) Hydrodynamic consequences of maintaining an upright posture by different magnitudes of stiffness and buoyancy in the tropical alga *Turbinaria ornata*. *Journal of Marine Systems* 49: 157-167
- Stewart HL (2006) Morphological variation and phenotypic plasticity of buoyancy in the macroalga *Turbinaria ornata* across a barrier reef. *Marine Biology* 149: 721-730
- Stiger V (1997) Contribution à l'étude de la biologie des populations de deux grandes algues brunes *Turbinaria ornata* (Turner) J. Agardh et *Sargassum mangaravense* (Grunow) Setchell, proliférant sur les récifs de la Polynésie française. Doctorat en écologie marine. Sciences, pp 268
- Stiger V, Deslandes E, Payri CE (2004) Phenolic contents of two brown algae, *Turbinaria ornata* and *Sargassum mangarevense* on Tahiti (French Polynesia): interspecific, ontogenic and spatio-temporal variations. *Botanica Marina* 47: 402-409
- Stiger V, Horguchi T, Yoshida T, Coleman AW, Masuda M (2000) Phylogenetic relationships of *Sargassum* (Sargassaceae, Phaeophyceae) with reference to a taxonomic revision of the section *Phyllocystae* based on ITS-2 nr DNA sequences. *Phycological research* 48: 251-260
- Stiger V, Payri CE (1999a) Spatial and seasonal variations in the biological characteristics of two invasive brown algae, *Turbinaria ornata* (Turner) J. Agardh and *Sargassum mangarevense* (Grunow) Setchell (Sargassaceae, Fucales) spreading on the reefs of Tahiti (French Polynesia). *Botanica Marina* 42: 295-306
- Stiger V, Payri CE (1999b) Spatial and temporal patterns of settlement of the brown macroalgae *Turbinaria ornata* and *Sargassum mangarevense* in a coral reef on Tahiti. *Marine Ecology Progress Series* 191: 91-100
- Subramonia Thangam T, Kathiresan K (1991) Mosquito larvicidal effect of seaweed extracts. *Botanica Marina* 34: 433-435
- Suzuki M, Kawamoto T, Vairappan CS, Ishii T, Abe T, Masuda M (2005) Halogenated metabolites from Japanese *Laurencia spp.* *Phytochemistry* 66: 2787-2793
- Svensson CJ, Pavia H, Toth GB (2007) Do plant density, nutrient availability, and herbivore grazing interact to affect phlorotannin plasticity in the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*. *Marine Biology* 151: 2177-2181
- Swanson AK, Druehl LD (2002) Induction, exudation and the UV protective role of kelp phlorotannins. *Aquatic Botany* 73: 241-253
- Sykes H (2007) Reef Monitoring : Status of Coral Reefs in the Fiji Islands, 2006. CRISP, pp 65

T

- Takada N, Watanabe R, Suenaga K, Yamada K, Uemura D (2001) Isolation and structures of hedaols A, B, and C, new bisNorditerpenes from a Japanese brown alga. *Journal of Natural Products* 64: 653-655
- Tanaka M, Leite F (2004) Distance effects on short-term recolonization of *Sargassum stenophyllum* by mobile epifauna, with an analysis of gammarid life habits. *Journal of the Marine Biological Association of the UK* 84: 901-910
- Tang H-F, Yi Y-H, Yao X-S, Xu Q-Z, Zhang S-Y, Lin H-W (2002) Bioactive steroids from the brown Alga *Sargassum carpophyllum*. *Journal of Asian Natural Products Research* 4: 95-101

- Targett N, Arnold T (2001) Effects of secondary metabolites on digestion in marine herbivores. In: McClintock JB, Baker BJ (eds) Marine chemical ecology. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 391–411
- Targett N, Boettcher A, Targett T, Vrolijk N (1995) Tropical marine herbivore assimilation of phenolic-rich plants. *Oecologia* 103: 170-179
- Targett NM, Arnold TM (1998) Predicting the effects of brown algal phlorotannins on marine herbivores in tropical and temperate oceans. *J. Phycol.* 34: 195-205
- Targett NM, Coen LD, Boettcher AA, Tanner CE (1992) Biogeographic comparisons of marine algal polyphenolics : evidence against a latitudinal trend. *Oecologia* 89: 464-470
- Taylor WR (1964) The genus *Turbinaria* in eastern seas. *Journal of the Linnean Society Botany* 58: 475-487
- Thomsen M, Wernberg T, Stæhr P, Pedersen M (2006) Spatio-temporal distribution patterns of the invasive macroalga *Sargassum muticum* within a Danish *Sargassum* -bed. *Helgoland Marine Research* 60: 50-58
- Toth G, Langhamer O, Pavia H (2005) Inducible and constitutive defenses of valuable seaweed tissues: consequences for herbivore fitness. *Ecology* 86: 612-618
- Toth G, Pavia H (2000a) Lack of phlorotannin induction in the brown seaweed *Ascophyllum nodosum* in response to increased copper concentrations. *marine ecology process series* 192: 119-126
- Toth G, Pavia H (2000b) Water-borne cues induce chemical defense in a marine alga (*Ascophyllum nodosum*). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97: 14418
- Toth G, Pavia H (2001) Removal of dissolved brown algal phlorotannins using insoluble polyvinylpyrrolidone (PVPP). *Journal of Chemical Ecology* 27: 1899-1910
- Treschow A, Hodges L, Wright P, Wynne P, Kalafatis N, Macrides T (2007) Novel anti-inflammatory -3 PUFAs from the New Zealand green-lipped mussel, *Perna canaliculus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 147: 645-656
- Tringali C (1997) Bioactive metabolites from marine algae: recent results. *Curr. Org. Chem* 1: 375-394
- Tsukamoto S, Hirota H, Kato H, Fusetani N (1994) Phlorotannins and Sulfoquinovosyl diacylglycerols: promoters of larval metamorphosis in Ascidians, isolated from brown alga *Sargassum thunbergii*. *Fisheries Science* 60: 319-321
- Tugwell S, Branch G (1989) Differential polyphenolic distribution among tissues in the kelps *Ecklonia maxima*, *Laminaria pallida* and *Macrocystis angustifolia* in relation to plant-defence theory. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 129: 219-230
- Turkmen N, Velioglu YS, Sari F, Polat G (2007) Effect of extraction conditions on measured total polyphenol contents and antioxidant and antibacterial activities of Black Tea. *Molecules* 12: 484-496

U

- Uhrmacher S, Hanelt D, Nultsch W (1995) Zeaxanthin content and the degree of photoinhibition are linearly correlated in the brown alga *Dictyota dichotoma*. *Marine Biology* 123: 159-165
- Underwood AJ (1997) *Experiments in Ecology: Their Logical Design and Interpretation Using Analysis of Variance*. Cambridge University Press, pp 504

V

- Vairappan CS, Suzuki M, Abe T, MaSuda M (2001) Halogenated metabolites with antibacterial activity from the Okinawan *Laurencia* species. *Phytochemistry* 58: 517-523
- Valls R, Banaigs B, Francisco C, Codomier L, Cave A (1986) An acyclic diterpene from the brown alga *Bifurcaria bifurcata*. *Phytochemistry* 25: 751-752
- Valls R, Banaigs B, Piovetti L, Archavilis A, Artaud J (1993) Linear diterpenes with antimutagenic activity from the brown alga *Bifurcaria bifurcata*. *Phytochemistry* 34: 1585-1588
- Valls R, Piovetti L (1995) The chemistry of the Cystoseiraceae (Fucales: Pheophyceae) : Chemotaxonomic Relationships. *Biochemical systematics and ecology* 23: 723-745
- Valls R, Piovetti L, Banaigs B, Archavilis A, Pellegrini M (1995) (S)-13-hydrogeranylgeraniol-derived furanoditerpenes from *Bifurcaria bifurcata*. *Phytochemistry* 39: 145-149
- Van Alstyne K, Whitman S, Ehlig J (2001) Differences in herbivore preferences, phlorotannin production, and nutritional quality between juvenile and adult tissues from marine brown algae. *Marine Biology* 139: 201-210

- Van Alstyne KL (1988) Herbivore grazing increases polyphenolic defenses in the intertidal brown alga *Fucus distichus*. *Ecology* 69: 655-663
- Van Alstyne KL, Ehlig JM, Whitman SL (1999a) Feeding preferences for juvenile and adult algae depend on algal stage and herbivore species, pp 179-185
- Van Alstyne KL, McCarthy JJ, Hustead CL, Duggins DO (1999b) Geographic variation in polyphenolic levels of Northeastern Pacific kelps and rockweeds, pp 371-379
- Van alstyne KL, Paul VJ (1990) The biogeography of polyphenolic compounds in marine macroalgae: temperate brown algal defenses deter feeding by tropical herbivorous fishes. *Oecologia* 84: 158-163
- van Leeuwe MA, Villerius LA, Roggeveld J, Visser RJW, Stefels J (2006) An optimized method for automated analysis of algal pigments by HPLC. *Marine Chemistry* 102: 267-275
- Vasco C, Ruales J, Kamal-Eldin A (2008) Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chemistry* 111: 816-823
- Velioglu YS, Mazza G, Gao L, Oomah BD (1998) Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products. *J. Agric. Food Chem.* 46: 4113-4117
- Viejo RM (1997) The effect of colonization by *Sargassum muticum* on tidepool macroalgal assemblages. *Journal of the Marine Biological Association of The United Kingdom* 77: 325-340
- Viejo RM, Arrontes J, Andrew NL (1995) An experimental evaluation of the effect of wave action on the distribution of *Sargassum muticum* in Northern Spain. *Botanica Marina* 38: 437-441

W

- Wada L, Ou B (2002) Antioxidant Activity and Phenolic Content of Oregon Caneberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 3495-3500
- Wakefield R, Murray S (1998) Factors influencing food choice by the seaweed-eating marine snail *Norrisianorrisi* (Trochidae). *Marine Biology* 130: 631-642
- Wattier R, Maggs CA (2001) Intraspecific variation in seaweeds: The application of new tools and approaches. *Advances in Botanical Research* 35: 171-212
- Wei Y, Shuguang Y (2002) Studies on the antioxidative activity of ethanolic extract from two kinds of brown algae. *Marine Sciences/ Haiyang Kexue* 26: 49-51
- Weldon SM, Mullen AC, Loscher CE, Hurley LA, Roche HM (2007) Docosahexaenoic acid induces an anti-inflammatory profile in lipopolysaccharide-stimulated human THP-1 macrophages more effectively than eicosapentaenoic acid. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 18: 250-258
- Wernberg T, Thomsen MS, Staehr PA, Pedersen MF (2001) Comparative phenology of *Sargassum muticum* and *Halidrys siliquosa* (Phaeophyceae: Fucales) in Limfjorden, Denmark. *Botanica Marina* 44: 31-39
- Wikström S, Pavia H (2004a) Chemical settlement inhibition versus post-settlement mortality as an explanation for differential fouling of two congeneric seaweeds. *Oecologia* 138: 223-230
- Wilkinson C (2006) Status of Coral Reefs of the World : summary of threats and remedial action. In: Reynolds IMCJD (ed) *Coral Reef Conservation*. Cambridge University Press & Zoological Society of London, Cambridge, pp 568
- Williams SL, Smith JE (2007) A Global Review of the Distribution, Taxonomy, and Impacts of Introduced Seaweeds, pp 327-359
- Winter F, Estes J (1992) Experimental evidence for the effects of polyphenolic compounds from *Dictyonema californicum* Ruprecht (Phaeophyta: Laminariales) on feeding rate and growth in the red abalone *Haliotis rufescens* Swainson. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 155: 263-277
- Womersley HBS (1964) The morphology and taxonomy of *Cystophora* and related genera (Phaeophyta). *Australian Journal of Botany* 12: 53-110
- Wong C-C, Cheung PC (2001) Influence of drying treatment on three *Sargassum* species. *Journal Applied of Phycology* 13: 43-50
- Wuitner E (1946) *Les Algues Marines des Côtes de France*. Paul Lechevalier, Paris, pp
- Wynne MJ (2002) *Turbinaria foliosa* sp. nov. (Fucales, Phaeophyceae) from the Sultanate of Oman, with a census of currently recognized species in the genus *Turbinaria*. *Phycological research* 50: 283-293

X

- Xu N, Fan X, Yan X, Tseng C (2004) Screening marine algae from China for their antitumor activities. *Journal of Applied Phycology* 16: 451-456

Y

- Yan X, Chuda Y, Suzuki M, Nagata T (1999) Fucoxanthin as the Major Antioxidant in *Hijikia fusiformis*, a Common Edible Seaweed. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 63: 605-607
- Yan X, Li X, Chengxu Z, Xiao F (1996) Prevention of Fish oil rancidity by phlorotannins from *Sargassum kjellmanianum*. *Journal of Applied Phycology* 8: 201-203
- Yan X, Nagata T, Fan X (1998) Antioxidative activities in some common seaweeds. *Plant Foods for Human Nutrition* 52: 253-262
- Yates JL, Peckol P (1993) Effects of nutrient availability and herbivory on polyphenolics in the seaweed *Fucus vesiculosus*. *Ecology* 74: 1757-1766
- Ye H, Wang K, Zhou C, Liu J, Zeng X (2008) Purification, antitumor and antioxidant activities in vitro of polysaccharides from the brown seaweed *Sargassum pallidum*. *Food Chemistry* 111: 428-432
- Yeh S, Lee C, Chen J (2006) Administration of hot-water extract of brown seaweed *Sargassum duplicatum* via immersion and injection enhances the immune resistance of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology* 20: 332-345
- Yuan YV, Walsh NA (2006) Antioxidant and antiproliferative activities of extracts from a variety of edible seaweeds. *Food and Chemical Toxicology* 44: 1144-1150

Z

- Zahra R, Mehrnaz M, Farzaneh V, Kohzad S (2007) Antioxidant activity of extract from a brown alga, *Sargassum boveanum*. *African Journal of Biotechnology* 6: 2740-2745
- Zhao G, Etherton TD, Martin KR, Vanden Heuvel JP, Gillies PJ, West SG, Kris-Etherton PM (2005) Anti-inflammatory effects of polyunsaturated fatty acids in THP-1 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 336: 909-917
- Zhu W, Chiu L, Ooi V, Chan P, Ang P (2004) Antiviral property and mode of action of a sulphated polysaccharide from *Sargassum patens* against herpes simplex virus type 2. *International journal of antimicrobial agents* 24: 279-283
- Zinedine A, Elakhdari S, Faid M, Benlemlih M (2004) Antifungal and anti-aflatoxinogenic activity of the brown algae *Cystoseira tamariscifolia*. *Journal de mycologie médicale* 14: 201-205
- Zlotkin E, Fraenkel G, Miranda F, Lissitzky S (1971) The effect of scorpion venom on blowfly larvae--a new method for the evaluation of scorpion venoms potency. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology* 9: 1
- Zubia Arrieta M (2003) La valorisation industrielle des Algues Brunes invasives (Fuciales) de Polynésie française: étude prospective pour lutter contre leur prolifération et contribuer à la gestion durable de l'environnement récifal. *Sciences, Papeete*, pp 295
- Zubia M, Fabre MS, Kerjean V, Le Lann K, Stiger-Pouvreau V, Fauchon M, Deslandes E (2009) Antioxidant and antitumoural activities of some Phaeophyta from Brittany coasts. *Food Chemistry* 116: 693-701
- Zubia M, Payri C, Deslandes E (2008) Alginate, mannitol, phenolic compounds and biological activities of two range-extending brown algae, *Sargassum mangarevense* and *Turbinaria ornata* (Phaeophyta: Fuciales), from Tahiti (French Polynesia). *Journal of Applied Phycology* 20: 1033-1043
- Zubia M, Payri C, Deslandes E, Guezennec J (2003) Chemical Composition of Attached and Drift Specimens of *Sargassum mangarevense* and *Turbinaria ornata* (Phaeophyta: Fuciales) from Tahiti, French Polynesia¹. *Botanica Marina* 46: 562-571
- Zubia M, Robledo D, Freile-Pelegrin Y (2007) Antioxidant activities in tropical marine macroalgae from the Yucatan Peninsula, Mexico. *Journal of Applied Phycology* 19: 449-458

RÉFÉRENCES ÉLECTRONIQUES

- [1] <http://www.cbd.int/>
- [2] <ftp://ftp.fao.org/fi/STAT/summary/default.htm#aqua>
- [3] www.ifremer.fr/rebent/
- [4] www.eaubretagne.fr
- [5] http://www.ird.nc/UR65/Vega/UpwellingPage/ATLAS_ZEE.htm
- [6] http://www.pharmacorama.com/ezine/ziconotide_prialt.php
- [7] <http://www.pharmacorama.com/ezine/20080225111909.php>

ANNEXES

Annexe III-1 : Principes des techniques utilisées

Pour mener à bien ces études concernant la chimiodiversité spécifique des Sargassaceae, nous avons utilisé divers techniques de chimie analytique, à savoir des techniques de spectroscopie et de chromatographie (Résonance Magnétique Nucléaire, Chromatographie sur Couche Mince Chromatographie Liquide couplée à la Spectroscopie de Masse, Chromatographie Gazeuse couplée à la Spectroscopie de Masse,). Le principe de ces techniques est expliqué dans ci-après.

Principe de la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

La résonance magnétique nucléaire ou RMN est une technique de spectroscopie non-invasive de plus en plus utilisée en biologie et en médecine. Elle permet d'accéder qualitativement aux structures des molécules et à leur environnement physico-chimique sans dégrader l'échantillon étudié. Cette technique est basée sur la possibilité de faire résonner différents noyaux dans un champ magnétique, donc sur leurs propriétés magnétiques et cinétiques.

La RMN pulsée à transformée de Fourier utilise les propriétés des noyaux en physique quantique : pour chaque noyau est défini un « spin » qui correspond à un moment cinétique (noté I). Placé dans un champ magnétique statique d'intensité B_0 , les moments magnétiques des noyaux vont s'orienter soit dans la direction du champ B_0 soit dans le sens opposé en fonction de leur état d'énergie, c'est-à-dire de leur spin. Les noyaux entre en résonance et se répartissent alors à la surface de deux cônes autour et dans le champ. Un second champ magnétique alternatif B_1 , appliqué perpendiculairement à B_0 , tourne autour de B_0 à une certaine fréquence (fréquence de Larmor des noyaux excités), ce qui induit une bascule de l'aimantation résultante (M_0) du plan xoz dans le plan xoy (Figure A.).

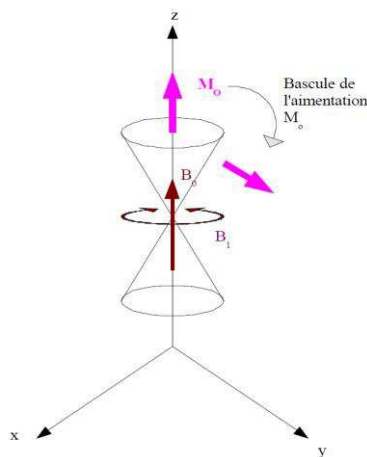


Figure A. : Schéma des champs magnétiques appliqués sur les noyaux lors d'une séance de RMN, et leur répartition en cône autour du champ magnétique statique B_0 .

Dès l'arrêt du champ B_1 , les spins des noyaux reviennent à leur équilibre initial en générant une onde électromagnétique, c'est la relaxation. L'aimantation M_0 va progressivement revenir à sa position primordiale autour

de l'axe z. La force électromotrice alternative, générée par les variations d'intensité enregistrées sur une bobine sur l'axe y, s'amortie exponentiellement.

Les fréquences de résonance des noyaux sont alors extraites du signal obtenu (interférogramme) en réalisant « une transformée de Fourier », ce qui permet d'obtenir un spectre RMN.

L'interprétation de la position, de l'aspect et de l'intensité des signaux du spectre permet ensuite d'obtenir des informations sur les molécules contenues dans l'échantillon. En effet, les fréquences de résonance des différents noyaux sont influencées par leur environnement au sein de des molécules car les noyaux sont aussi sous l'influence de champs magnétiques locaux formés par les spins des noyaux voisins. Les signaux de chacun des noyaux peut alors se scinder en plusieurs raies, d'après la relation suivante : $2nI+1$ où n est le nombre de voisins du noyau considéré et I est le nombre de spin du noyau (par exemple $\frac{1}{2}$ pour ^1H). Ainsi la multiplicité du signal de même que les fréquences de résonance des différents noyaux renseignent sur leur environnement au sein de la molécule et permettent donc d'accéder à la structure de cette molécule (Figure B.).

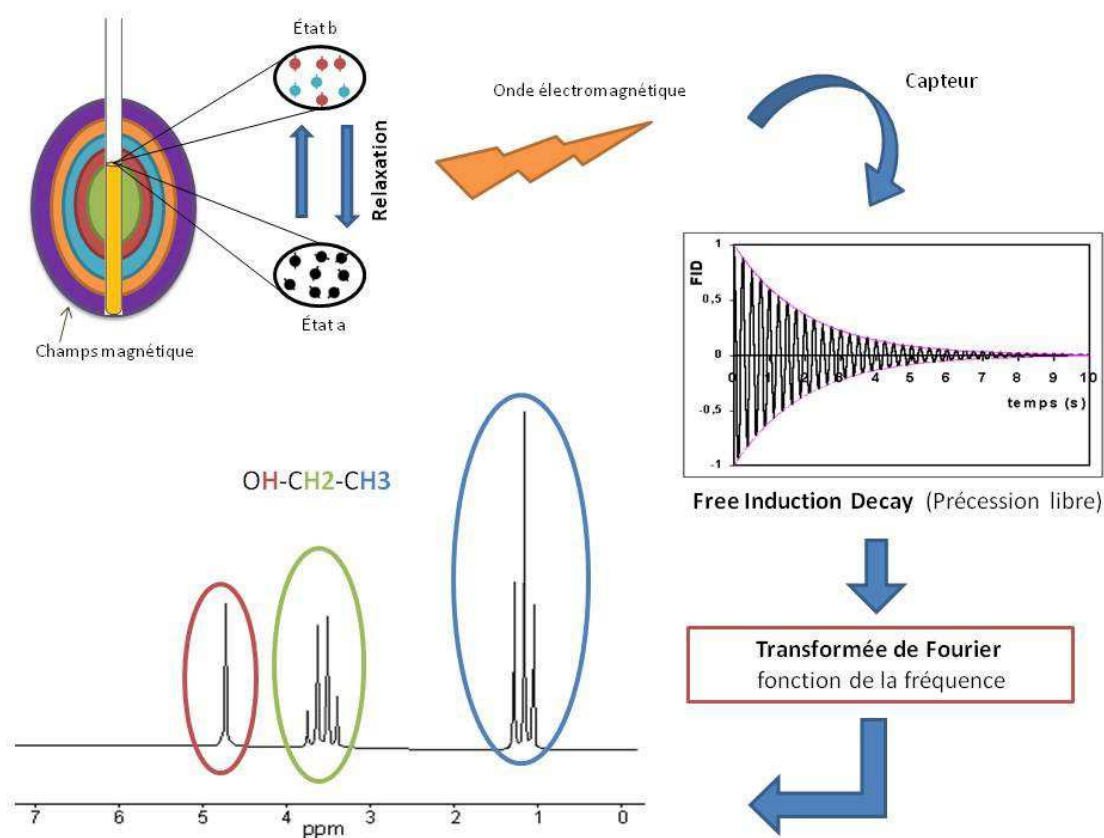


Figure B : Illustration schématique du principe de la RMN.

RMN HR-MAS (High Resolution Magic Angle Spinning³)

Cette technique empruntée à la ^1H -RMN (ou RMN du proton) des solutions est basée sur la rotation de l'échantillon suivant un axe orienté à l'angle magique ($54,7^\circ$) à une vitesse élevée (de l'ordre du kHz). La RMN HR-MAS (ou RMN *in vivo*) permet d'obtenir des spectres d'échantillons hétérogènes, solides ou liquides mais généralement non transformés (échantillons de tissus vivants, lyophilisés, secs...) d'une résolution proche de celle rencontrée en RMN haute résolution des solutions. C'est une technique puissante et de plus en plus utilisée Desmoulin *et al.* 2008.

RMN des solutions

RMN du proton (^1H -RMN)

Le proton est un noyau de spin $\frac{1}{2}$ très abondant dans la nature. Il est très facilement détectable car ses propriétés électromagnétiques le rendent très sensible en RMN. Les extraits ont été solubilisés dans du CDCl_3 (chloroforme deutéré : les protons (H) du CHCl_3 ont été remplacés par des noyaux Deutérium (D)). Des solvants deutérés sont utilisés en RMN car ils permettent de stabiliser les échantillons, d'effectuer le réglage de l'homogénéité du champ magnétique par observation du Deutérium et de minimiser le signal du solvant. En effet les noyaux Deutérium n'ont pas la même fréquence de résonance que les noyaux Hydrogène, ils sont donc invisible en RMN du proton, néanmoins le solvant reste visible sur le spectre RMN car les produits deutérés n'ont jamais un taux d'enrichissement isotopique de 100%.

RMN du carbone (^{13}C -RMN)

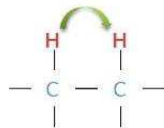
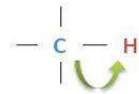
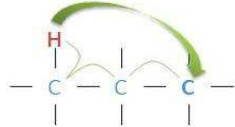
La RMN du carbone permet de différencier les carbones portants 1 ou 3 protons des carbones quaternaires ou portant 2 protons. Les premiers conduiront à un signal " négatif " les seconds à un signal "positif " dans le spectre.

RMN à deux dimension (RMN 2D)

Des séquences impulsionnelles en deux dimensions ont été mises en œuvre, avec notamment des séquences homonucléaires ^1H - ^1H (CORrelation SpectroscopY ou COSY) et des séquences hétéronucléaires ^1H - ^{13}C du types HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence) et HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation). Ces séquences impulsionnelles, permettent de caractériser les couplages entre deux noyaux et de déterminer plus précisément les structures moléculaires (tableau II.1).

³ Haute résolution à l'angle magique

Tableau A. : Illustration des différents types de couplages utilisés lors des séquences de RMN 2D

Type de séquence	Type de couplage
COSY : Obtention de la carte des corrélations ^1H - ^1H via les couplages scalaires	
HMQC : obtention de la carte des corrélations ^1H - ^{13}C via les couplages en 1J	
HMBC : obtention de la carte des corrélations ^1H - ^{13}C via les couplages en nJ ($1 < n < 4$).	

Principe de la Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une technique classique de chimie analytique qui repose principalement sur des phénomènes d'adsorption. La CCM consiste en une phase mobile (un solvant ou un mélange de solvants) qui progresse le long d'une phase stationnaire (généralement un gel de silice déposé en couche mince sur une plaque d'aluminium). Le mélange à analyser (quelques μL) est déposé sur la phase stationnaire, puis la plaque (sur laquelle on a déposé l'échantillon) est placée dans une cuve chromatographique saturée en solvant constituant la phase mobile. L'éluant monte alors à travers la phase stationnaire, essentiellement par capillarité. Les constituants du mélange se séparent par migration différentielle : chacun d'eux est d'autant plus entraîné par l'éluant qu'il est plus soluble dans celui-ci et moins adsorbé sur la phase stationnaire. Les substances migrent donc à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant. Les composés se déplacent donc alternativement de la phase stationnaire à la phase mobile, l'action de rétention de la phase stationnaire étant principalement contrôlée par des phénomènes d'adsorption. Généralement, en chromatographie sur couche mince, les substances de faible polarité migrent plus rapidement que les composants polaires. Après migration les taches, surtout lorsqu'elles ne sont pas colorées, sont révélées par observation à la lumière UV (lorsque la plaque de silice comporte un indicateur de fluorescence) et/ou par pulvérisation d'un réactif caractéristique (figure C). Les R_f (Facteur de Rétention) de chaque tache peuvent être ensuite calculés comme suit : $R_f = d/d_s$ avec d la distance parcourue par le composé (mesure au centre de la tache) et d_s la distance parcourue par le front du solvant. Pour un couple éluant et support déterminé, le R_f d'une substance est une constante caractéristique. Il est toujours indépendant de la longueur de bande utilisée. Sa détermination peut donc être précieuse pour l'identification. Les taches peuvent être récupérées en grattant la tache et en filtrant la poudre ainsi obtenue sur du coton de verre.

Principe de la Chromatographie Liquide couplée à la spectrométrie de masse

La Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse ou LC/MS (Liquide Chromatography / Mass Spectrometry) est une technique de chimie analytique qui combine les capacités de séparation de la Chromatographie Liquide Haute Pression (CLHP) aux capacités d'analyses de la spectroscopie de masse. Cette technique est puissante, sensible et spécifique. En générale, la LC/MS est utilisée pour des détections spécifiques de molécules et/ou l'identification de substances particulières présentes en mélanges. Ce paragraphe décrit plus particulièrement le principe de la chromatographie liquide dont un système complet est illustré à la figure C. Le principe de la spectrométrie de masse sera décrit dans un paragraphe ci-après. La CLHP est une technique d'analyse séparative quantitative et/ou qualitative qui repose sur la séparation des composés présents dans le mélange à analyser.

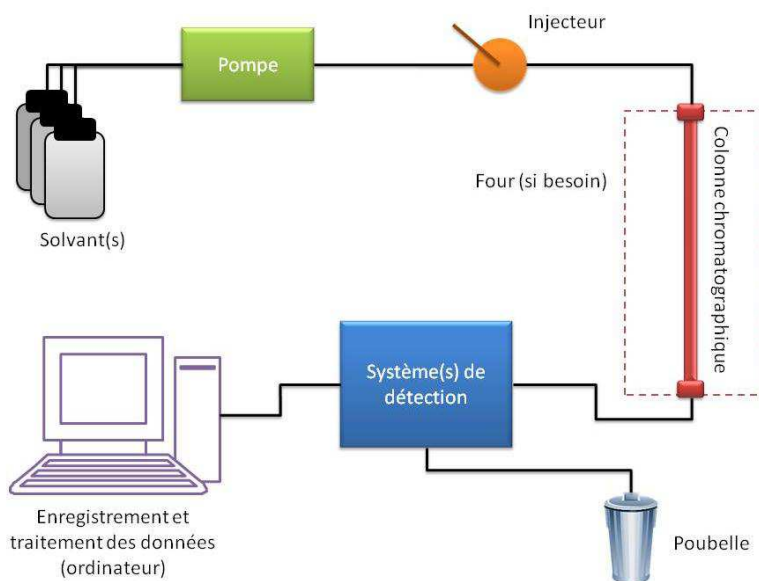


Figure C. : Illustration schématique d'un système de CLHP.

Ces composés sont entraînés par une phase mobile à travers une phase stationnaire. La phase mobile ou éluant peut être composée d'un ou plusieurs solvants en mélange isocratique ou non. La phase stationnaire (il en existe de nombreux type) est contenue dans une colonne dite colonne chromatographique. L'échantillon à analyser est injecté dans le circuit et entraîné par la phase mobile dans la colonne. La séparation s'opère alors selon les interactions chimiques et/ou physiques des analytes de l'échantillon à analyser avec les deux phases (mobiles et stationnaire). Dans le cas d'une chromatographie de partage, comme dans notre étude, les analytes sont séparés en fonction de leur affinité avec les deux phases, affinité qui dépend de la polarité des composés de l'échantillon ainsi que de celle des phases mobile et stationnaire. Plus les analytes auront d'affinité avec la phase mobile, plus ils sortiront vite de la colonne. Ainsi, en chromatographie liquide de phase normale, la phase stationnaire étant polaire (gel de silice par exemple) et l'éluant apolaire, ce sont les composés les plus apolaires qui seront élués en premiers et

les plus polaires en dernier. En chromatographie liquide de phase inverse, la phase stationnaire étant apolaire (C18 par exemple) et la phase mobile polaire, ce seront les analytes les moins apolaires qui seront élués en premier et les plus polaires en derniers. La détection des analytes s'effectue par divers systèmes. Dans le cas de notre étude, nous avons utilisé un spectromètre de masse, une détection UV par barrette d'iode et une détection à diffusion de la lumière (ou ELSD : Evaporative Light Scattering Detector).

Principe de la Chromatographie Gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

La Chromatographie Gazeuse couplée à la spectrométrie de masse ou (GC/MS pour Gas Chromatography and Mass Spectrometry) est une technique de chimie analytique qui allie les propriétés de la chromatographie en phase gazeuse à celles de la détection par spectrométrie de masse. C'est une technique très répandue utilisée dans de nombreux domaines tels que l'industrie agroalimentaire, la médecine, la pharmacologie ou l'environnement. Ce paragraphe décrit principalement le principe de la Chromatographie en phase Gazeuse. Le principe de la spectrométrie de masse étant décrit dans le paragraphe suivant.

Le principe de la séparation par Chromatographie en phase Gazeuse consiste à partager l'échantillon à analyser entre deux phases. L'une de ces phases est un liquide stationnaire uniformément réparti sous forme d'une pellicule mince sur un solide inerte de grande surface, tandis que l'autre phase est un gaz mobile qui s'écoule à travers l'ensemble stationnaire. L'échantillon à analyser est introduit sous forme liquide dans le système via un injecteur. L'injecteur permet de vaporiser instantanément l'échantillon avant que celui-ci ne soit transféré dans la colonne. La température de l'injecteur doit être supérieure d'environ 20°C à la température du produit le moins volatil. Le gaz employé, c'est-à-dire la phase mobile, est un gaz inerte (hélium ou azote) qui est dit vecteur ou porteur. Ce gaz pousse les constituants de l'échantillon (rendu volatiles par l'injecteur) à travers la colonne. La colonne (ici colonne capillaire) est longue (de 10 à 100m) et très fine (0,1 à 0,5 mm de diamètre interne), elle est constituée d'un tube de silice fondue dont la paroi interne est couverte d'un film chimique nommé "phase stationnaire", la paroi externe de la colonne est gainée d'un revêtement en polyimide qui lui confère souplesse et robustesse. La phase stationnaire, d'une épaisseur de 0,1 à 5 µm, est caractérisée par les fonctions chimiques greffées sur la silice. Elle peut être « peu polaire » (chaînes alcanes ou groupements phényles, par exemple) ou polaire (polyéthylènes glycols par exemple). Les différences de propriétés physicochimiques des analytes leur confèrent des vitesses d'éluion différentes, ils sont donc séparés en fonction du temps. Les divers appareillages sont placés dans des systèmes à thermostats pour obtenir la température adéquate au maintien des composés sous formes volatiles. A la sortie de la colonne, la détection des analytes s'effectue généralement par conductibilité thermique (ou catharomètre), ionisation de flamme ou spectrométrie de masse (cas de notre étude). La figure D ci-dessous illustre un système de chromatographie gazeuse.

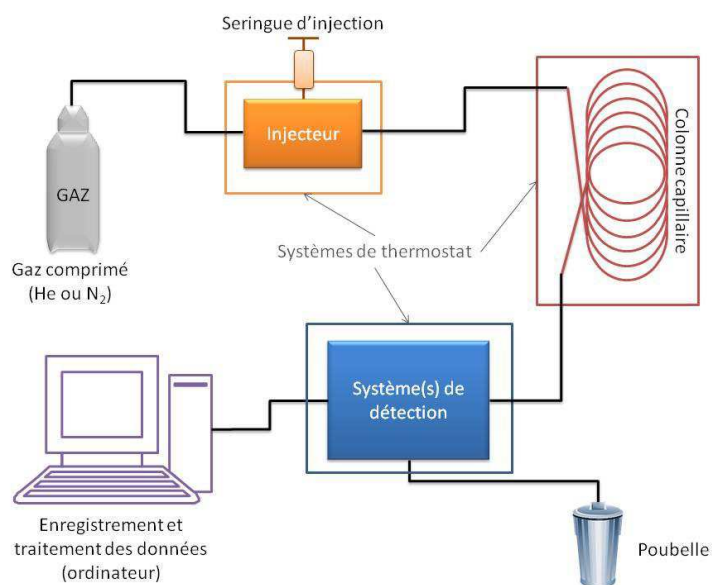


Figure D. Illustration schématique d'un système de Chromatographie Gazeuse.

Principe de la détection par la spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique physique d'analyse permettant de détecter et d'identifier les analytes par la mesure de leur masse. Son principe réside dans la séparation d'ions moléculaires en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z). La spectrométrie de masse est utilisée dans tous les domaines scientifiques tels que l'astrophysique, la chimie (analytique et organique), la biologie et la médecine. Un spectromètre de masse est constitué de trois éléments : une source d'ionisation, un analyseur de masse et un détecteur. Ces trois éléments sont sous vide (figure E.).

- **La source d'ionisation** est la partie du spectromètre de masse où sont produits les ions moléculaires (ions gazeux) à partir des molécules introduites dans le système. Il existe plusieurs types de source : l'ionisation par électronébulisation (électrospray ou ESI), l'ionisation électrique (ou EI), l'ionisation chimique (ou CI), l'ionisation par bombardement rapides (FAB), l'ionisation chimique à pression atmosphérique et la désorption-ionisation laser assistée par matrice (ou MALDI). L'électrospray est généralement utilisé en LC/MS alors que l'ionisation électrique et l'ionisation chimique sont plutôt utilisées en GC/MS.
- **L'analyseur de masse** sépare les ions générés par la source en fonction de leur rapport m/z (masse sur charge). Il existe plusieurs types d'analyseurs : les analyseurs TOF, qui mesurent la vitesse des ions et leur séparation dans le temps, les analyseurs quadripôles qui mesurent la transmission des ions à travers un champ électromagnétique et les analyseurs de type « trappe à ions » ou « pièges à ions » qui mesurent le mouvement périodique des ions dans un champ magnétique ou électrodynamique.

- **Le détecteur** permet d'une part de détecter les ions proportionnellement à leurs nombres et d'autre part de convertir les ions en énergie (en électron ou en photon par exemple) puis amplifier le courant correspondant pour le rendre détectable par le système. Les détecteurs les plus répandus sont des multiplicateurs de photons ou d'électrons.

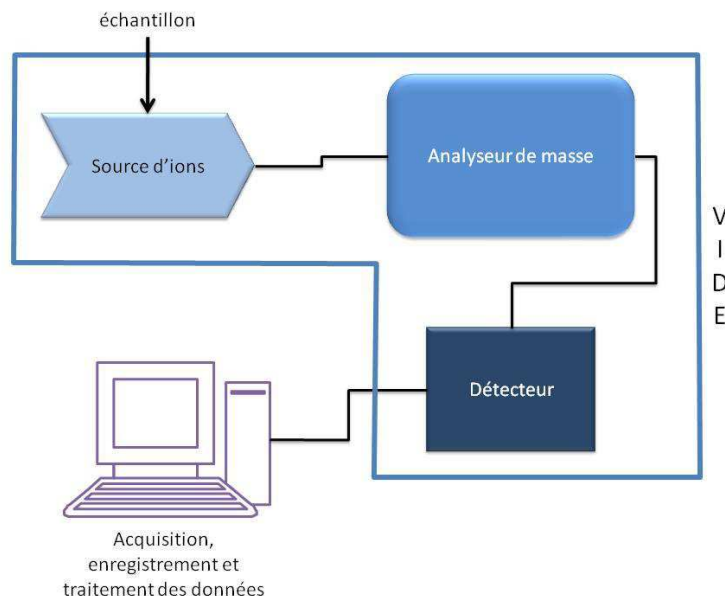


Figure E : Illustration schématique d'un système de spectrométrie de masse

Annexe III-2 : Révélateurs et molécules révélées

UV : Révélation des plaques sous lampe UV 365:254 nm (VL-6-L6 6W, Fisher Bioblock Scientific).

Dichlorofluoresceine : pulvériser 0,2 % de 2',7'-Dichlorofluoresceine (Sigma-Aldrich) en solution dans de l'éthanol (éthanol pur, VWR) puis sécher la plaque au sèche-cheveux, pulvériser de l'eau et révéler à 365 nm.

➔ Permet de révéler les lipides de façon non spécifique qui apparaissent sous forme de spots jaunes clairs sur fond jaune-vert.

Orcinol : 200 mg d'Orcinol monohydrate 99% (Acros Organics) dissout dans 100 mL d'acide sulfurique à 75% (Sulfuric Acid 95%, VWR). Révélation après 10-15 min à 100°C.

➔ Permet de révéler les glycolipides et dérivés qui apparaissent en taches bleues sur fond beige

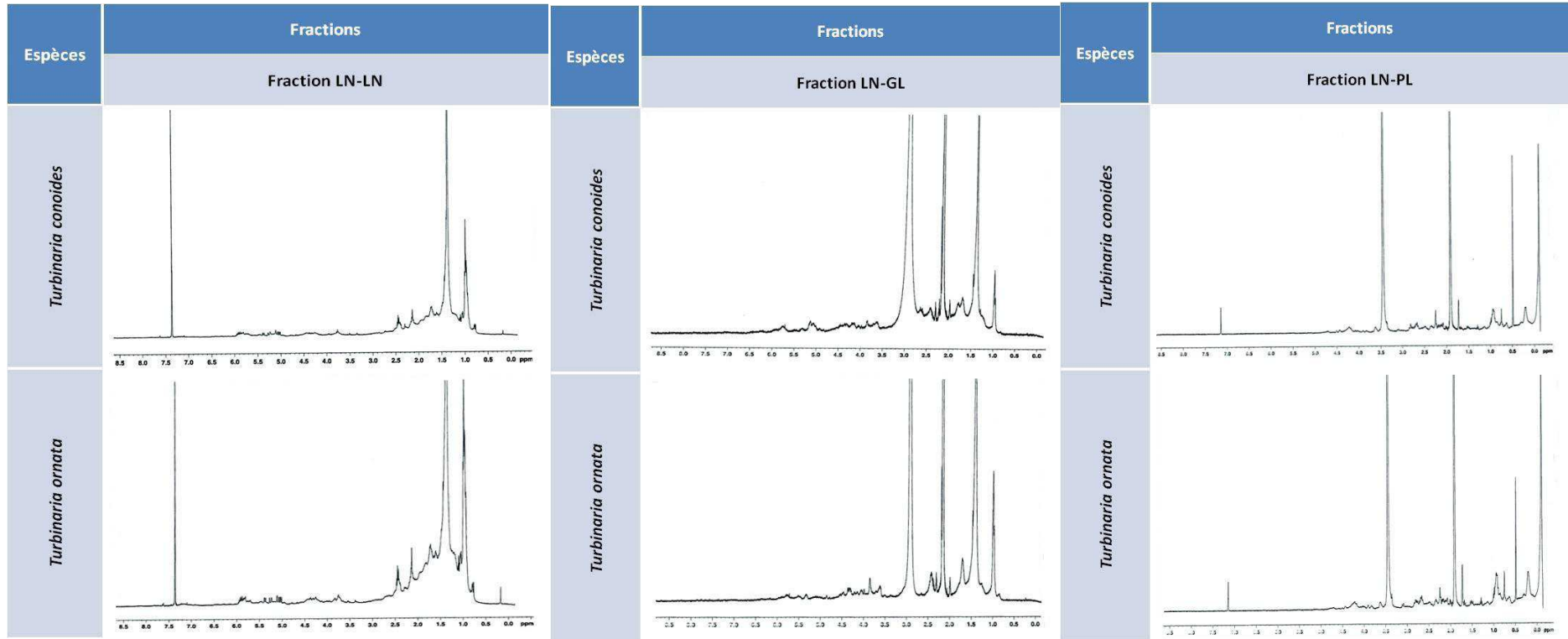
Diphenylamine : 2 g de Diphenylamine 98% (Sigma-Aldrich) dissout dans 20 mL d'éthanol (éthanol pur, VWR). Rajouter à cette solution 100 mL d'acide chlorhydrique à 37% (Hydrochloric Acid 37%, VWR) et 80 mL d'acide acétique glacial (Glacial Acetic Acid, VWR). Révélation des taches bleues-grises sur fond gris pâle après 20-25 min à 105°C.

➔ Permet de révéler les glycolipides et dérivés.

Acide orthophosphorique & sulfate de cuivre : Solution d'acide orthophosphorique à 8 % (Orthophosphoric Acid 85%, Carlo Erba) mélangée à une solution de sulfate du cuivre (Sigma-Aldrich) à 3%.

➔ Permet de révéler les lipides de façon non spécifique qui apparaissent sous forme de spots bruns foncés au bout de 5-10 min à 100°C.

Annexe III-3. : Spectres ^1H -RMN des sous fractions LN-LN , LN- et LN-PL des extraits apolaires de *Turbinaria conoides* et *T. ornata* de Nouvelle Calédonie (site de Ouiné).



LN-LN : fraction Lipides Neutres, sous fraction Lipides Neutres, LN-GL : fraction Lipides Neutres, sous fraction Glycolipides et LN-PL : fraction Lipides Neutres, sous fraction Phospholipides.

Annexes IV-1 : protocole flash chromatographie

Cartouche utilisée : C18/30g

- Eau:MeOH (80:20, v:v) à 2mL/min pendant 2min
- Le débit monte ensuite à 20mL/min en 1 min
- Puis, le solvant d'élution passe de 20% de MeOH à 100% de MeOH en 13 min.
- Elution à 100% de MeOH pendant 2 min.
- Puis, en 8 min, le solvant passe de 100% de MeOH à 100% de dichloromethane.
- Ensuite, élution à 100% de DCM pendant 4 min.

Annexe IV-2 : Données des spectres RMN du proton (¹H-RMN) et du carbone (¹³C-RMN) et attributions des signaux d'après Culioli *et al.* 1999a. Les données RMN de Culioli *et al.* 1999a ont été rajoutés pour comparaison.

H	CDCL ₃ (500 MHz)	CDCL ₃ (400 MHz) Culioli <i>et al.</i> 1999a	C	CDCL ₃ (125 MHz)	CDCl ₃ (100 MHz) Culioli <i>et al.</i> 1999a	Attribution
1	4,15 <i>d</i>	4,13 <i>d</i> (6,5)	1	59,44	59,2	CH ₂
2	5,41 <i>t</i>	5,39 <i>t</i> (6,5)	2	123,4	123,4	CH
3	-	-	3	139,7	139,4	C
4	2,02 <i>m</i>	2,02 <i>m</i>	4	39,5	34,4	CH ₂
5	2,10 <i>m</i>	2,09 <i>m</i>	5	26,3	26,2	CH ₂
6	5,11 <i>t</i>	5,10 <i>t</i> (6,5)	6	124,0	124,0	CH
7	-	-	7	135,1	135,0	C
8	2,20 <i>m</i>	2,02 <i>m</i>	8	39,4	39,3	CH ₂
9	2,10 <i>m</i>	2,09 <i>m</i>	9	26,8	26,7	CH ₂
10	5,23 <i>t</i>	5,22 <i>t</i> (6,5)	10	129,2	129,1	CH
11	-	-	11	129,6	129,5	C
12	3,02 <i>s</i>	3,01 <i>s</i>	12	55,4	55,3	CH ₂
13	-	-	13	199,5	199,5	C
14	6,11 <i>s</i>	6,10 <i>s</i>	14	122,9	122,8	CH
15	-	-	15	155,6	155,6	C
16	1,87 <i>s</i>	1,86 <i>s</i>	16	27,7	27,7	CH ₃
17	2,13 <i>s</i>	2,12 <i>s</i>	17	20,7	20,6	CH ₃
18	1,61 <i>s</i>	1,59 <i>s</i>	18	16,3	16,3	CH ₃
19	1,61 <i>s</i>	1,59 <i>s</i>	19	16,0	15,9	CH ₃
20	1,68 <i>s</i>	1,66 <i>s</i>	20	16,4	16,2	CH ₃

NOUVEAU CHAPITRE DE LA THESE®

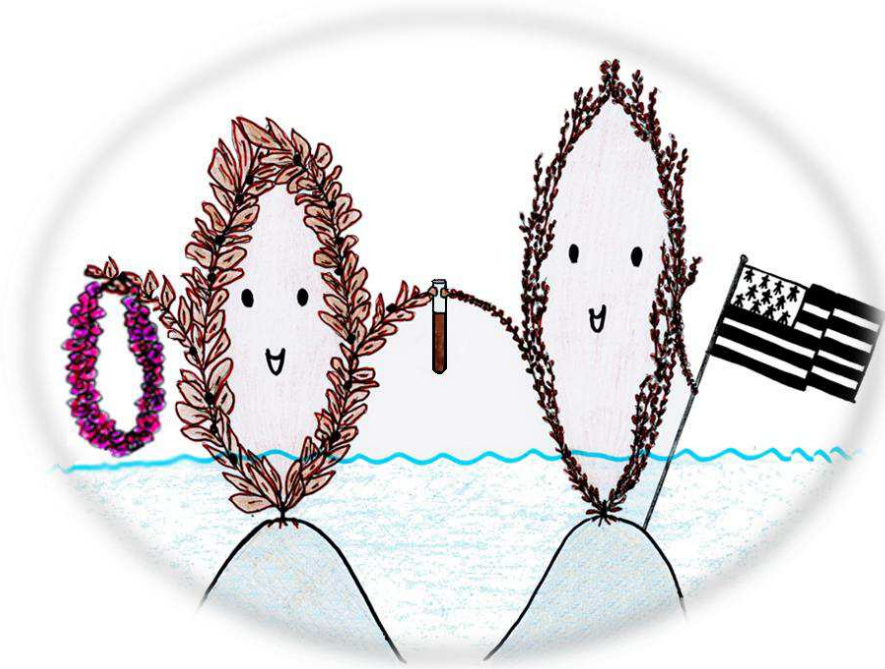
Klervi Le Lann

Ecole Doctorale des Sciences de la Mer n° 156

Université de Bretagne Occidentale, Brest

Mentor : Yanys E. Wessels

Etude et valorisation d'algues brunes



Laboratoire d'Ecophysiologie et de Biotechnologie des Halophytes et des Algues Marines
(LEBHAM) – EA 3877

Encadrement

Mme Valérie Stiger-Pouvreau, Maître de Conférences, directrice de thèse

Soutenance prévue : le 27 novembre 2009

1. Cadre général et enjeux de la thèse.....	1
1.1. Présentation.....	1
1.2. Enjeux.....	3
1.3. Place de la thèse dans le projet global de l'équipe.....	3
1.4. Situation au regard de la concurrence.....	3
1.5. Compétences mises à disposition du projet de thèse.....	4
1.6. Appartenance de l'équipe à un ou des réseaux.....	4
1.7. Les raisons de faire une thèse et de travailler sur ce sujet.....	5
1.8. Rôle dans la définition et la programmation du projet.....	5
2. Déroulement, gestion et coût du projet.....	5
2.1. Préparation, financement et cadrage du projet de thèse.....	5
2.2. Conduite de projet.....	6
2.3. Evaluation et prise en charge du coût du projet.....	9
3. Compétences, savoir-faire, qualités professionnelles et personnelles.....	11
3.1. Domaines d'expertise et connaissances acquises.....	11
3.2. Compétences méthodologiques.....	12
3.3. Savoir –faire.....	13
3.4. Qualités personnelles.....	14
3.5. Construction d'un réseau professionnel personnel.....	15
3.6. Transférabilité de ces compétences.....	15
4. Résultats et impacts de la thèse.....	15
4.1. Pour le laboratoire.....	15
4.2. Pour les partenaires du projet.....	16
4.3. Personnel.....	16

1. Cadre général et enjeux de la thèse

1.1. Présentation

Je suis biologiste et je travaille sur des **algues marines**. Mon travail de thèse s'articule autour de 3 axes majeurs : **la défense** chimique des algues marines, **la diversité** chimique de ces algues et **la recherche de composés**, issus de ces algues, ayant un effet sur la santé, c'est-à-dire la recherche de **composés bioactifs**.

Les algues sont depuis longtemps utilisées par l'Homme dans l'alimentation (en Asie, surtout) ou comme engrais (comme en Bretagne par exemple). Depuis ces 50 dernières années, l'utilisation des algues marines s'est faite à la fois plus pointue et plus diversifiée. Les algues font partie dorénavant de notre vie quotidienne. Elles sont présentes, par exemple, dans notre alimentation et nos cosmétiques sous forme d'**épaississants** et de **gélifiants**.

Les algues marines sur lesquelles je travaille sont des **algues brunes** de climat tempéré (Europe) et de climat tropical. Ces algues brunes présentent toutes des caractéristiques communes et font partie de **la famille des Sargassacées**. Pour étudier ces algues brunes, des espèces facilement accessibles et présentes en grande quantité sur le littoral sont nécessaires. Pour le **milieu tempéré**, j'ai choisi 2 sites aux environs de Brest (un site sableux abrité et un site rocheux exposé aux vagues et à la houle) où vivent 3 espèces : *Sargassum muticum*, *Bifurcaria bifurcata* et *Cystoseira baccata*. Pour le **milieu tropical**, trois zones géographiques du Pacifique Sud ont été considérées : les îles Salomon, les îles Fidji et la Nouvelle Calédonie, où j'ai étudié différentes espèces de *Turbinaria* et de *Sargassum*, dans le cadre d'un projet de recherche sur les récifs coralliens⁴.

Pour étudier la défense chimique de ces algues brunes, je me suis intéressée aux **composés phénoliques**. Les composés phénoliques sont des **molécules antioxydantes** que fabriquent les algues pour se protéger des agressions de l'environnement. En effet, comme tous les êtres vivants, les algues doivent faire face à des **stress** (autres algues, virus, bactéries, UV, brouteurs...) qui peuvent provoquer leur mort. **Ces molécules antioxydantes** vont permettre **d'améliorer la survie des cellules** et donc celle de l'algue. Afin d'étudier la défense chimique des Sargassacées, j'ai considéré le potentiel protecteur de ces **composés phénoliques** en mesurant leur quantité et leur qualité antioxydante. Pour le milieu tempéré, j'ai effectué ces mesures tous les mois pendant 1 an 1/2 sur les 3 espèces d'algues brunes en provenance des deux sites d'étude. Durant ces 18 mois, j'ai aussi effectué d'autres observations telles que les variations de la taille ou de la période de reproduction afin de mieux comprendre l'écologie de ces 3 espèces. En milieu tropical, par contraintes économiques, un seul prélèvement par site a été effectué. Les quantités de composés phénoliques et leur activité antioxydante associée ont été mesurées. J'ai ainsi montré que la quantité et la qualité des composés phénoliques des algues brunes n'est pas la même en fonction de l'espèce, de la saison, du site et du climat. La **protection chimique** des espèces étudiées est donc **fonction de l'environnement** dans lequel elles vivent.

Concernant **la diversité chimique** de ces algues, je me suis intéressée d'une part à l'algue brune tempérée *Bifurcaria bifurcata* et d'autre part à deux espèces de *Turbinaria* (algues brunes tropicales) qu'il est difficile de distinguer par leur forme. Dans le cas de *Bifurcaria bifurcata*, j'ai étudié les différences de la composition chimique de cette algue en fonction du lieu où elle vit. Dans celui des *Turbinaria*, j'ai recherché des molécules qui permettraient de différencier ces deux espèces d'algues brunes.

Enfin, concernant la recherche de molécules issues des algues et présentant un intérêt pour la santé, je me suis intéressée à 3 activités : la lutte contre le cancer (**activité anticancéreuse**), contre les maladies neurodégénératives (**test de neuroactivité**) et contre les inflammations (**activité anti-inflammatoire**). J'ai ainsi pu isoler, chez des algues tropicales, des acides gras présentant une activité anti-inflammatoire.

⁴ Programme CRISP : "Coral Reef Initiative for South Pacific"

Ce travail de thèse a permis de mieux connaître et de mieux comprendre la **diversité de la défense chimique** des algues de la famille des Sargassacées. Ce travail a aussi permis de montrer que la **diversité chimique** existante chez ces algues brunes est fonction de l'espèce et dans certains cas du site dans lequel vit l'algue. De plus, ce travail a montré que les molécules issues des Sargassacées peuvent avoir des applications potentielles dans le domaine médical. Au cours de ma thèse j'ai eu donc l'opportunité de travailler sur **le littoral breton, au laboratoire**, mais aussi avec de **nombreux collaborateurs**.

1.2. Enjeux

Ma thèse comporte plusieurs enjeux qui ont été regroupés sous trois grands types d'enjeux : les enjeux scientifiques, les enjeux techniques et les enjeux environnementaux.

Enjeux scientifiques

Les travaux menés dans le cadre de mon projet de thèse correspondent à de **la recherche fondamentale**. Ce projet s'articule autour de **3 axes majeurs** : la défense chimique des algues marines, la diversité chimique de ces algues et la recherche de **composés bioactifs** (c'est-à-dire des composés ayant un effet bénéfique sur la santé humaine). Cette étude a été menée en **milieu tempéré** sur une espèce invasive (*S. muticum*) et deux espèces natives (*C. baccata* et *B. bifurcata*) et en **milieu tropical** sur différentes espèces de Sargassacées du Pacifique Sud.

Enjeux techniques

D'un point de vue technique, le projet port **deux objectifs principaux** :

1. mise en place **d'un suivi écologique** à moyen terme (18 mois) en milieu tempéré
2. **isolement de composés** bioactifs.

Enjeux environnementaux

Les enjeux de ce travail sont aussi environnementaux. En effet, ce projet vise à améliorer les connaissances actuelles sur l'écologie des Sargassaceae. Ceci devrait permettre la **préservation de la biodiversité** de ces algues brunes. Ce projet s'inscrit dans un programme international intitulé « **CRISP** : Coral Reef Initiative for South Pacific ». Ce programme, financé en partie par l'Agence Française pour le Développement (AFD), a pour but l'amélioration de **la gestion durable des récifs coralliens** en partenariat avec les populations locales. Pour cela, le programme finance, entre autre, l'étude de la biodiversité des récifs coralliens des îles du Pacifique Sud (îles Salomon, îles Fidji...).

1.3. Place de la thèse dans le projet global de l'équipe

Ce travail a été réalisé dans le cadre du Laboratoire d'Ecophysiologie et de Biotechnologie des Halophytes et des Algues Marines (LEBHAM, EA⁵ 3877) qui se situe au sein de l'Institut Européen de la Mer (IUEM) à Plouzané et qui dépend de l'Université de Bretagne Occidentale (UBO).

Le laboratoire travaille sur **deux thématiques** : la connaissance des peuplements végétaux marins et l'étude des substances naturelles issues de ces végétaux. Avec l'étude des populations de Sargassacées des côtes bretonnes et du pacifique Sud et la recherche de biomolécules actives, ma thèse porte donc sur les deux thématiques développer par le LEBHAM et **s'intègre donc complètement** au projet global de l'équipe.

⁵ EA : Equipe d'Accueil

1.4. Situation au regard de la concurrence

Ma thèse prend place dans une mouvance internationale de recherche de composés bioactifs issus de la biologie marine. Cependant, au sein du programme CRISP, seul mon projet de thèse porte sur les algues. De plus, le LEBHAM collabore avec de nombreux phytochimistes⁶, mais peu travaillent sur les mêmes espèces d'algues marines que le laboratoire.

Du point de vue de l'écologie, une possible concurrence existe avec des équipes de chercheurs basées au **Portugal** et en **Espagne** qui travaillent, eux aussi, sur les Sargassacées tempérées.

Mes travaux ne sont pas confidentiels. Une partie a déjà été publiée dans des revues scientifiques internationales ou ont fait l'objet de communications lors de congrès en France ou à l'étranger.

1.5. Compétences mises à disposition du projet de thèse

Un tableau situé en annexe (tableau 1) détaille les compétences humaines mise à disposition lors de mon projet de thèse. Il s'agit du personnel technique du laboratoire, des stagiaires ayant travaillé sur mon projet de thèse et surtout des chercheurs avec lesquels j'ai eu l'opportunité de collaborer aux cours de ces 3 dernières années.

Compétences scientifiques

Au sein du LEBHAM, mon encadrante est Dr. Valérie Stiger-Pouvreau. Par son intermédiaire, j'ai eu l'opportunité de travailler et d'échanger avec des chercheurs de différents laboratoires (cf. détails tableau 1 en annexe).

Compétences techniques et humaines

Travaillant au sein du LEBHAM, j'ai utilisé le matériel du laboratoire tel que des évaporateurs rotatifs, la chaîne de CLHP (Chromatographie Liquide Haute Pression) ou des spectromètres. J'ai également collaboré avec le service commun de RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) de l'UBO ainsi qu'avec l'équipe Ingénierie des matériaux polymères et des biomolécules marines du laboratoire Matériaux Polymères - Interfaces - Environnement Marin (MAPIEM) (Unité de Recherche EA 4323) de l'université du Sud Toulon-Var. Durant le séjour que j'ai effectué au sein de ce laboratoire, j'ai pu utiliser divers systèmes de chromatographies (Flash chromatographie, chromatographie préparative et chromatographie Liquide couplée à un spectroscope de masse).

Tout au long de ma thèse, j'ai également bénéficié de l'aide d'une secrétaire, de techniciennes et de stagiaires (détails tableau 1 en annexe) mais aussi l'aide des autres doctorants du LEBHAM (Laetitia Méot-Duros, Camille Jégou, Mélanie Huppel, Stéphanie Bondu) lors des expérimentations de laboratoire et des suivis terrains.

1.6. Appartenance de l'équipe à un ou des réseaux

Le LEBHAM se situe au sein de l'Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM) à Plouzané, institut dépendant de l'Université de Bretagne Occidentale (Brest). Le laboratoire a été créé en 1992 lors du Symposium International sur les algues à Brest.

⁶ Phytochimistes : qui étudient la chimie des plantes

Le LEBHAM est fortement impliqué dans la filière algues en Bretagne participant, aux projets appliqués via la chambre syndicale des Algues. De plus, grâce à l'implication du laboratoire dans un réseau international de recherche, plusieurs étudiants ont pu développer des **collaborations à l'international** et effectuer des missions à l'étranger en cours de thèse (Chine, Japon, Grèce, Irlande, Angleterre).

Le laboratoire fait partie du programme **CRISP** (Coral Reef Initiative for South Pacific) qui l'amène à **collaborer** avec des **équipes françaises métropolitaines** (l'ICSN⁷ de Gif/Yvette, Isomer de l'université de Nantes, le Muséum National d'Histoire Naturel (MNHN) de Paris, Institut de Recherche pour le Développement (IRD) de Toulouse) mais aussi **d'outre mer** (IRD de Nouméa, Nouvelle Calédonie). De plus, le LEBHAM fait parti d'un nouveau Groupement de Recherche « **GDR 3269 - BioChiMar**⁸ » auquel appartiennent plusieurs équipes telles que l'ICSN de Gif/Yvette et le laboratoire MAPIEM de Toulon.

1.7. Les raisons de faire une thèse et de travailler sur ce sujet

Très tôt j'ai exprimé mon désir de travailler en biologie et plus particulièrement en **biologie marine**. Après une première année de classe préparatoire aux grandes écoles « Biologie Chimie Sciences de la Terre » suivie d'une deuxième année de DEUG⁹ « Biologie des organismes et des populations » à Pau (Pyrénées Atlantiques), je suis entrée en Licence « Biologie des Organismes et des Populations » à l'UBO afin de pouvoir intégrer le **master Sciences de la Mer et du Littoral**, mention Sciences Biologiques Marines proposé par l'IUEM.

Au cours de la première année de master, j'ai eu l'opportunité d'effectuer mon stage d'initiation à la recherche au sein du LEBHAM, sous la direction de Mme Valérie Stiger-Pouvreau. Suite à ce stage, Mme Stiger-Pouvreau m'a proposé d'effectuer mon stage de recherche de master 2 au sein du LEBHAM. Proposition que j'ai acceptée. Il est à noter que ce stage de Master 2 rentrait dans le cadre de la première année du programme CRISP. Les résultats obtenus au cours de ces deux stages ont fait l'objet de publications scientifiques¹⁰.

A la fin de mon stage de recherche de Master 2, Mme Stiger-Pouvreau a proposé un sujet de thèse ouvert à mobilité, en vue d'une allocation de recherche du Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche. Ce sujet regroupant les thématiques de mes stages de Master 1 et de Master 2 m'a tout de suite intéressé. J'ai donc postulé pour ce sujet de thèse et obtenu l'allocation de recherche.

1.8. Rôle dans la définition et la programmation du projet

A la fin de mon stage de master 2, j'ai participé activement à **l'établissement du sujet de thèse**. Ce sujet a été formulé tout exprès pour moi, étant la suite logique de mes deux précédent stages. Concernant l'orientation et la programmation du sujet de ma thèse, ma directrice, Mme Stiger-Pouvreau me fait entièrement **confiance**, tout en recadrant les choses au besoin (suivi, questionnement...).

⁷ L'ICSN (Institut de Chimie des Substances Naturelles) fait partie du CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique)

⁸ BioChiMar : Biodiversité et Chimie Marine

⁹ DEUG : Diplôme d'Etudes Universitaires Générales

¹⁰ Plouguerné et al, 2006 et Le Lann et al, 2008a

2. Déroulement, gestion et coût du projet

2.1. Préparation, financement et cadrage du projet de thèse

Evaluation des facteurs de succès et de risques & stratégie de maîtrise des risques envisagés

- Risque de manque de corrélation : dès l'écriture du sujet de thèse apparaissait le risque de ne pas pouvoir relier les études effectuées en milieu tropical de celles effectuées en milieu tempéré. Ce risque a été réduit par le choix d'étudier les mêmes sortes de composés dans les deux milieux (composés phénoliques et fucoxanthine).
- Risque d'absences de verrous scientifiques : *Sargassum muticum*, algue de milieu tempéré, a été beaucoup étudiée depuis les années 1970, elle est donc bien connue. Néanmoins je n'étudie pas cette algue seule, mais en relation avec d'autres espèces d'algues peu étudiées (*Bifurcaria bifurcata* et *Cystoseira baccata*). De plus, les algues du pacifique Sud qui nous ont intéressées au cours de cette étude sont peu étudiées, ce qui apporte un **coté original** à mon projet de thèse.

Choix des partenaires nationaux et internationaux

Les premiers partenaires sont ceux du programme **CRISP** et du **service commun de RMN** de l'UBO. J'avais déjà collaboré avec eux lors de mon stage de Master 2. J'ai donc continué ces partenariats au cours de mes trois années de thèse.

Suite aux résultats de mon stage de Master 2 et de ma première année de thèse, j'ai été amenée à collaborer avec **Vassilios Roussis**, de l'Université d'Athènes, en Grèce, car j'ai rencontré des difficultés dans l'identification de biomolécules actives en anti-inflammatoire. Les résultats obtenus ont donné lieu à une communication par voie d'affiche (poster) au 5^{ème} congrès européen sur les produits naturels marins (V ECMNP¹¹) qui s'est déroulé à Ischia (Italie) en septembre 2007.

Au cours de ce congrès, nous (Valérie Stiger-Pouvreau et moi-même) avons rencontré **Gérald Culioli**, enseignement –chercheur à l'université de Toulon, qui s'est montré vivement intéressé par une collaboration entre nos deux laboratoires. C'est ainsi que j'ai pu passer 1 mois au sein du laboratoire MAPIM à Toulon afin de me former aux diverses techniques de chromatographies préalablement citées.

Lorsque j'ai rencontré des soucis dans l'isolement et l'identification des acides gras chimiomarqueurs de *Turbinaria ornata* et *Turbinaria conoides*, Valérie Stiger-Pouvreau m'a présenté **Edouard Kraffe**, spécialiste des lipides marins, afin qu'il m'aide dans cette démarche. **Edouard Kraffe** avait déjà collaboré avec le LEBHAM lors de la thèse d'Erwan Plouguerné. Cette collaboration s'est donc poursuivie avec mon projet de thèse.

Financement

Le **Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche** assure le versement mensuel de mon allocation de recherche. Le programme **CRISP** assure une partie du financement du fonctionnement. Le solde est financé sur les fonds propres du laboratoire.

Gestion des aspects contractuels

Aucune clause de confidentialité n'a été fixée concernant mes travaux. Aucun brevet n'a prévu pour le moment.

¹¹ V ECMNP : 5th European Congress in Marine Natural Products

2.2. Conduite de projet

Principales étapes

J'ai des **discussions régulières** avec ma directrice de thèse, Mme Valérie Stiger-Pouvreau. Nous faisons un point rapide sur l'avancement de mes travaux **tous les 15 jours** environ, soit par courriel, soit de visu, en fonction de la disponibilité de chacune. Tous les 6 mois, nous nous réunissons durant environ une demi-journée pour faire un point plus complet. En octobre 2007 et octobre 2008, j'ai produit un document relatant les résultats obtenus au cours de l'année incluant **un planning prévisionnel** concernant les travaux de recherches à mener à bien.

Afin de mettre en place une stratégie d'expérimentation et un plan d'expérience, je me suis appuyée sur des travaux publiés dans des journaux et des revues scientifiques internationales.

Comme le montre le diagramme de Gantt ci-après, j'ai **mené de front** :

- un suivi écologique
- la recherche de biomolécules

De ce fait, le déroulement de ma thèse s'est effectué de manière un peu chaotique certainement du à un manque d'organisation du travail à effectuer.

Gestions des relations avec les partenaires scientifiques

Concernant le programme CRISP, une réunion conventionnelle s'est tenue tous les ans début janvier. J'ai participé à la réunion de janvier 2007, en compagnie de Valérie Stiger-Pouvreau et du Pr. Eric Deslandes (alors Directeur du laboratoire). Valérie Stiger-Pouvreau s'est chargé de produire le rapport annuel à transmettre au responsable du programme CRISP.

Concernant les autres partenaires scientifiques, les relations sont irrégulières et s'effectuent essentiellement par courriel ou par téléphone en fonction du besoin de chacun.

Problèmes rencontrés et solutions apportées

Comme dans toute équipe de recherche, le principal problème rencontré concerne l'utilisation du matériel de laboratoire (Evaporateur rotatifs, spectromètres, lyophilisateur). En effet, le matériel doit être partagé entre les nombreux utilisateurs du laboratoire et cela peut générer des conflits. Cela est résolu par des **négociations** avec les autres thésards et la mise en place de plannings d'utilisation du matériel.

De nombreuses **discussions informelles** avec les doctorants du laboratoire et ma directrice de thèse m'ont permis de résoudre certains points qui me causaient des soucis.

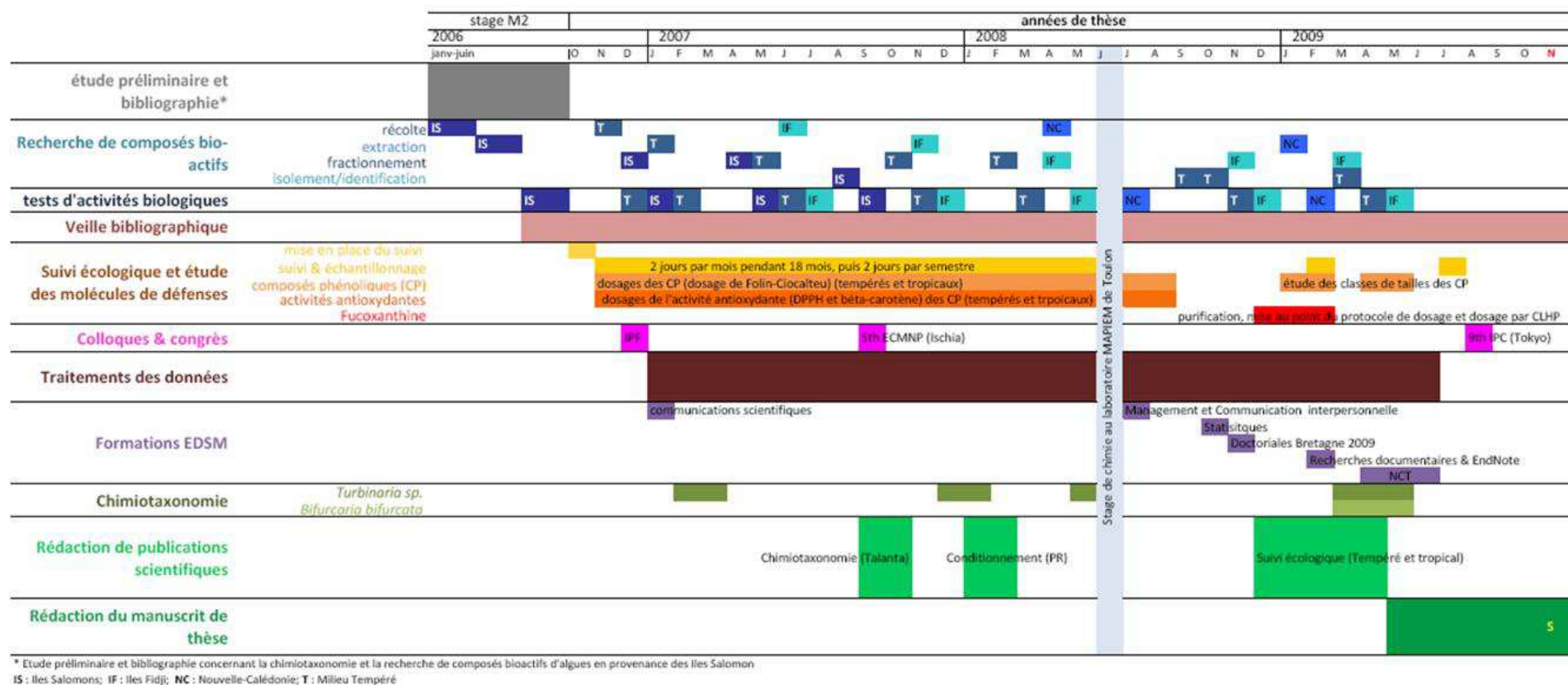


Figure 1 : Diagramme de Gantt illustrant le déroulement du projet de thèse d'octobre 2006 à Novembre 2009

2.3. Evaluation et prise en charge du coût du projet

Le budget de ma thèse, évalué d'octobre 2006 à novembre 2009, s'élève à **163 K€**.

Les fonds alloués à ce projet de thèse ont de différentes origines, comme le montre le diagramme ci-dessous (Figure 2).

L'UBO est le contributeur principal. En effet 73% des fonds proviennent de l'Université et représentent essentiellement les salaires (120 K€). Le détail des origines des fonds est présenté en annexe (tableau 3).

La principale dépense est occasionnée par **les ressources humaines** qui représentent 83% du budget avec 134 K€. Ces dépenses correspondent à mon salaire, à celui de ma directrice de thèse et à l'aide technique au laboratoire (techniciennes et stagiaires). La répartition des dépenses est représentée en Figure 3 et le détail de ces dépenses est présenté en annexe (tableau 3).

Un tableau croisé Dépenses/Origines des fonds est présenté en annexe (tableau 3).

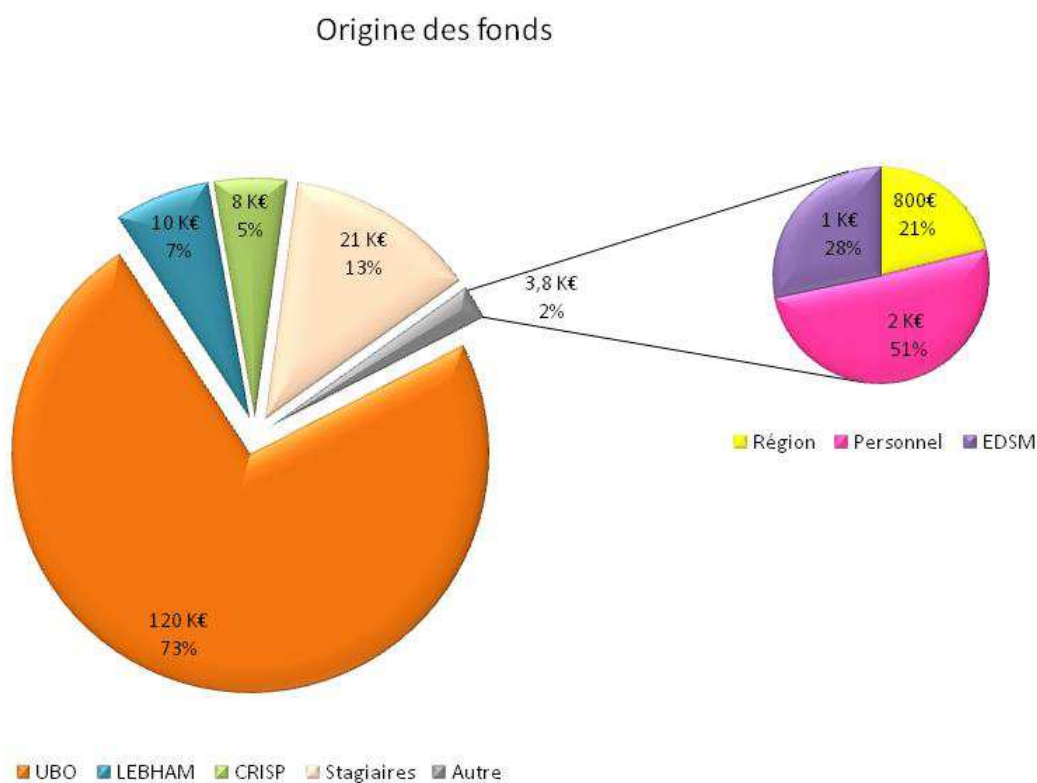


Figure 2 : Origine des fonds alloués au projet de thèse

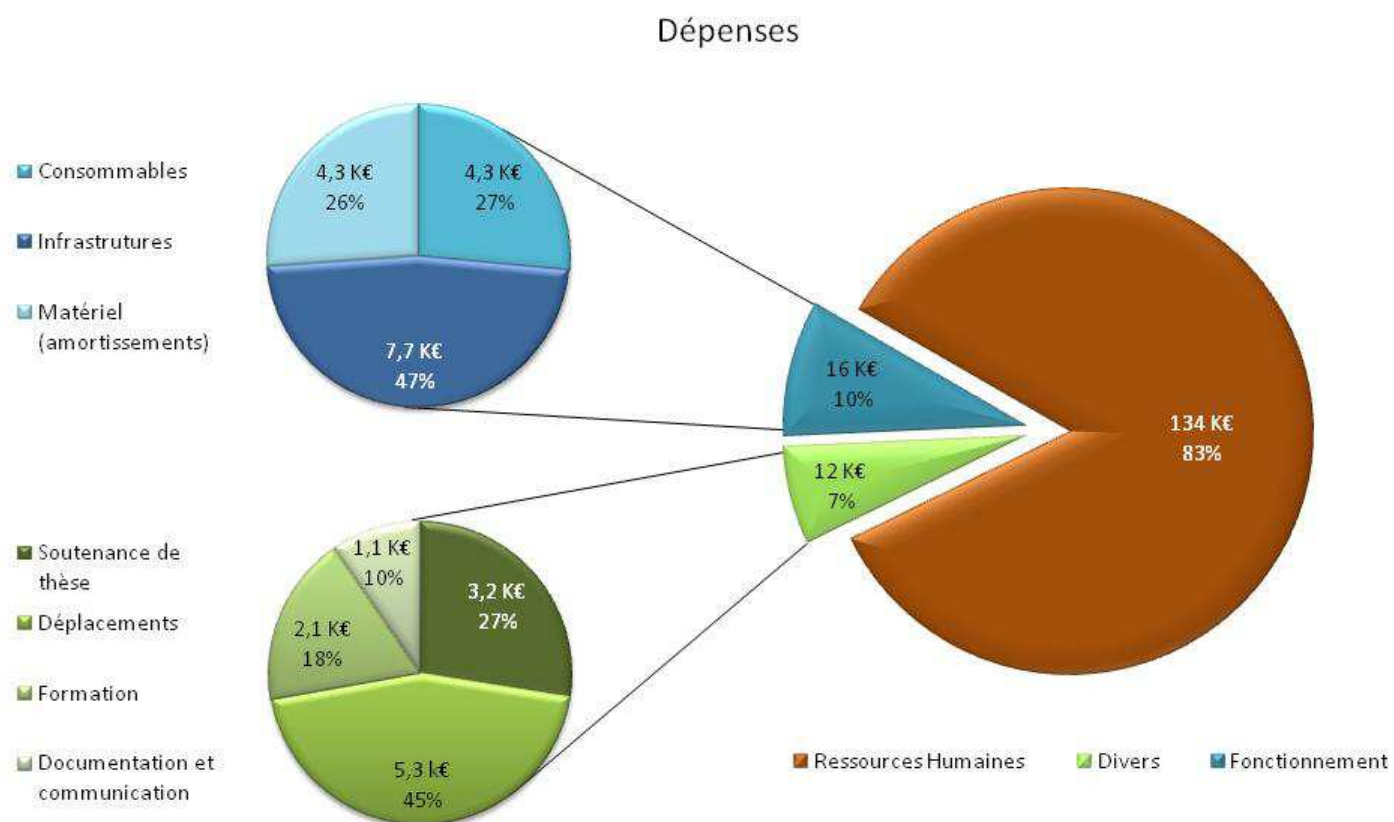


Figure 3 : Répartition des dépenses

3. Compétences, savoir-faire, qualités professionnelles et personnelles

3.1. Domaines d'expertise et connaissances acquises

Ma thèse portant sur trois domaines différents (la défense chimique des algues marines, la diversité chimique de ces algues et la recherche de composés bioactifs) et nécessitant un travail sur le terrain, j'ai acquis pendant ces trois années de thèse des **compétences** dans **trois grands domaines** :

- **en biochimie :**
 - Méthodes d'extraction :
 - liquide-solide (sous agitation et sous ultra-son)
 - liquide-liquide (séparation de phase)
 - Méthodes de purification :
 - Chromatographie sur Couche Mince (CCM)
 - Chromatographie Liquide Moyenne Pression (CLMP)
 - Flash Chromatographie
 - Chromatographie Préparative
 - Dialyses
 - Dosages colorimétriques :
 - des composés phénoliques
 - sur microplaques de composés antioxydants
 - Autre dosage :
 - par Chromatographie Liquide Haute Pression (CLHP)
 - Identification de biomolécules :
 - Par RMN (Proton, Carbone, 1et2D)
 - **Par Chromatographie Liquide couplé à la masse (LC/MS)**
- **en écologie benthique :**
 - mise en place d'un suivi à moyen termes (18 mois) d'algues brunes :
 - mesures mensuelles *in situ* de plusieurs variables écologiques telles que la taille, la densité ou l'index de maturité
 - étude de la biologie des populations des espèces de Sargassacées :
 - traitements statistiques des données récoltées sur le terrain
- **en écophysiologie des algues brunes :**
 - étude des composés de défenses des Sargassacées portant sur :
 - les teneurs en composés phénoliques en relation avec les données écologiques et/ou environnementales (traitements statistiques)
 - les activités antioxydantes des composés phénoliques en relation avec les données écologiques et/ou environnementales (traitements statistiques)
 - les classes de composés phénoliques en relation avec les données écologiques et/ou environnementales (traitements statistiques)
 - les teneurs en fucoxanthine en relation avec les données écologiques et/ou environnementales (traitements statistiques)

Parallèlement, j'ai utilisé de **nombreux outils informatiques** pour :

- **la recherche et veille bibliographique**

- moteurs de recherche spécialisés (Google Scholar)
- bases de données spécifiques (Currents Contents, ASFA, ISI of Science)
- sites internet des journaux scientifiques (ScienceDirect, Inter Research Science Center, Wiley InterScience)
- **le stockage et traitement des références bibliographiques**
 - utilisation de EndNote en environnement Windows
- **le traitement des données scientifiques :**
 - utilisation de logiciel de statistiques
 - Statistica
 - Statgraphics
 - utilisation de logiciel de traitements des données CLHP
 - Millenium (Waters)
- **la production de communications scientifiques**
 - production d'articles et de rapports scientifiques avec Microsoft Word
 - réalisation de présentations orales et de posters avec Microsoft PowerPoint
- **le traitement d'images**
 - GIMP

3.2. Compétences méthodologiques

Gestion de projet et encadrement

Lors de mon premier mois de thèse, avant de commencer les expérimentations et le suivi terrain, j'ai établi **un diagramme de Gantt** afin de **planifier** et de **structurer** les différentes tâches que j'avais à effectuer au cours de ma thèse et donc de mener à bien mon projet de thèse.

Durant ma thèse, j'ai encadré des étudiants en stage au LEBHAM. Chaque stage consistait en un projet de recherche précis. Mon rôle a donc constitué à **établir le sujet** de chaque stage et ensuite à **conduire le projet** de l'accueil du stagiaire jusqu'à la rédaction d'un rapport de stage par l'étudiant. Pour ce faire, j'ai **formé** et **encadré** les stagiaires lors des expériences au laboratoire et des sorties terrains. Je les ai **orientés** lors de l'analyse des données, de l'exploitation et de l'interprétation des résultats. Je les ai également **conseillés** lors de la rédaction de leur rapport de stage et de la préparation de leur présentation (le rapport de stage et la présentation fessaient partie de leur cursus universitaire).

Communication

Au cours de mes trois années de thèse, j'ai aussi eu l'opportunité d'effectuer quelques **vacations**. J'ai ainsi **enseigné** à des étudiants de niveau Licence 3, Master 1 et Master 2. Les cours dispensés portaient sur l'écologie et l'écophysiologie des algues ainsi que sur les techniques et méthodes d'analyses de chimiotaxonomie. De plus, j'ai participé au salon d'orientation AZIMUT, au village des sciences de Brest 2008, aux journées portes ouvertes de l'UBO et de l'IUEM, aux Doctoriales de Bretagne 2008 ainsi qu'au forum des doctorants de l'EDSM¹². Ces enseignements et

¹² EDSM : Ecole Doctorale des Sciences de la Mer

ces diverses manifestations m'ont permis de développer mes **capacités de présentation et de vulgarisation scientifique**. J'ai développé ce dernier point en encadrant d'une part un groupe de lycéennes de 1^{ère} S venue faire leur TPE (Travaux Pratiques Encadrés) au LEBHAM et d'autre part une jeune élève de seconde effectuant un stage volontaire d'observation d'une semaine au laboratoire.

Lors de ces années de thèse, j'ai également participé à différents **congrès** dans lesquels j'ai présenté mes travaux de recherche sous forme de posters et de communication orale. J'ai ainsi pu développer mes **capacités de synthèse et de présentation** de résultats scientifiques (cf. annexe « publication scientifique »).

Gestion du temps

Une partie de mon travail est lié à l'échantillonnage et au suivi *in situ*. Pendant 18 mois, j'ai dû **gérer le temps imparti** entre ce travail sur le terrain (2 jours par mois), les expériences en laboratoire et l'encadrement des stagiaires. Certaines expériences (tests de bioactivités) étaient effectuées par des collaborateurs dans le cadre du programme CRISP. Les **délais** pour obtenir les résultats étaient **variables et dépendaient des collaborateurs**. Il fallait donc que je **gère** cet aspect du projet dans la gestion de mon temps de travail.

Négociation et travail d'équipe

Le LEBHAM est une petite équipe de recherche (10 enseignants-chercheurs, 2 chercheurs contractuels, 1 Attachée Temporaire à l'Enseignement et à la Recherche (ATER), 6 doctorants, 2 techniciennes et 1 secrétaire), néanmoins des **négociations** sur l'utilisation des ressources (salles et équipements) ont été nécessaires afin de permettre à tous de travailler dans les meilleures conditions possibles.

Les formations de l'EDSM en management et communication interpersonnelle m'ont permis de mieux appréhender le travail en équipe et donc de **faciliter les échanges**, les discussions et les négociations avec les stagiaires comme avec les autres membres du laboratoire.

3.3. Savoir-faire

Administratif

La secrétaire du laboratoire n'est employée qu'à mi-temps. Ceci nécessite donc une implication des doctorants dans la partie administrative de leur thèse et partiellement du laboratoire. J'ai ainsi rédigé des **demandes de devis** et des **bons de commandes** ce qui a entraîné des contacts par courriels ou téléphones avec les fournisseurs.

Chaque année, j'ai établi un dossier auprès de l'administration de l'IUEM afin de pouvoir effectuer quelques vacances.

J'ai effectué moi-même mes inscriptions aux divers congrès auxquels j'ai participé, ce qui m'a amené à avoir des contacts avec les organisateurs.

J'ai également monté un dossier de **demande de subvention** auprès de l'UBO et de la Région Bretagne afin de participer à un congrès au Japon (9th IPC¹³, Tokyo, Août 2009).

¹³ IPC : International Phycological Congress

Organisationnel

J'ai acquis un savoir-faire organisationnel en mettant en place le **travail de terrain** (établissement des ordres de missions, réservation des véhicules), celui en laboratoire (réservation du matériel et des salles), mais aussi **en encadrant et formant** des stagiaires.

Linguistique

L'anglais étant la langue internationale de la recherche, j'ai amélioré quotidiennement mon anglais scientifique et technique par **la lecture et la rédaction d'articles scientifiques**. Lors de mes participations aux différents congrès internationaux, j'ai tenté d'améliorer mes compétences en anglais parlé.

3.4. Qualités personnelles

Au cours de ma thèse, j'ai pu mettre en œuvre et développer certaines de mes qualités personnelles. Je les ai regroupées en 5 points qui sont détaillés ci-après en m'inspirant du résultat du test PerformanSe. Le résultat de ce test est cohérent avec mon ressenti.

Créer et Innover

Au cours de mon stage de Master 2 j'ai **mis au point une nouvelle méthode** permettant de distinguer deux espèces d'algues très proches du point de vue de leur forme. Après avoir consolidé, optimisé et validé cette méthode, un article, décrivant cette nouvelle méthode et les résultats obtenus, est paru dans une revue scientifique internationale concrétisant ainsi mon travail.

J'ai également **mis en point un protocole** de purification de la Fucoxanthine avec les moyens matériels du laboratoire.

A l'occasion des portes ouvertes de l'IUEM en mars 2009, **j'ai créé**, pour le laboratoire, **un marque-page** faisant office de carte de visite du LEBHAM. Ce marque-page a eu beaucoup de succès tant auprès des visiteurs que des membres du laboratoire.

Encadrer et Animer

J'ai **encadré** successivement 6 stagiaires au cours de ma thèse. Lors de chaque stage, j'ai d'abord formé l'étudiant afin qu'il puisse avoir la plus grande autonomie possible. Je l'ai ensuite encadré et **conseillé** en restant à son écoute et à sa disposition. Il est souvent arrivé que le stagiaire ait une ou plusieurs idées permettant d'apporter un plus à son étude. Nous avons (l'étudiant et moi-même, en concertation avec Valérie Stiger-Pouvreau) tout fait pour mettre en œuvre l'idée de l'étudiant, avec généralement de bons résultats.

J'ai également **animé plusieurs stands** lors de diverses manifestations (stand du LEBHAM lors de journées portes ouvertes de l'IUEM, celui de l'IUEM lors des journées portes ouvertes de l'UBO, village des sciences à Brest 2008...).

Echanger, Argumenter et Négocier

Travailler dans un laboratoire signifie **partager** la place et le matériel. J'ai donc développé une aptitude à **l'échange** et à **la négociation** avec tous les utilisateurs (stagiaires, doctorants, chercheurs) afin de pouvoir travailler dans les meilleures conditions possibles.

Lors de mes échanges avec ma directrice de thèse, j'ai su **argumenter** afin de négocier certains points de ma thèse mais j'ai aussi pris en compte ses avis et ses conseils afin d'améliorer d'autres points. Une **relation de confiance et d'écoute** mutuelle s'est ainsi mise en place.

Capacité d'analyse et de synthèse

Au cours de mon travail de thèse, j'ai été amené à rédiger des rapports d'activité, des articles scientifiques et des communications par voie d'affiche (posters). Ceci m'a permis de développer mes **capacités d'analyses et de synthèse des résultats**.

S'adapter

Au cours de mes différents stages et même au sein de mon projet de thèse, j'ai du travailler sur différents thèmes et dans différents domaines de recherches tel que l'écologie, l'écophysiologie, la biochimie ou la biotechnologie. J'ai su m'**approprier** différentes techniques de chimie alors que ma formation initiale est une formation de biologiste. Durant ma thèse, j'ai effectué un séjour dans un autre laboratoire (le laboratoire MAPIEM) à Toulon. J'ai su m'y **adapter** et m'y **intégrer**.

3.5. Construction d'un réseau professionnel personnel

Tous les membres du laboratoire, les différents chercheurs avec qui j'ai eu l'occasion de collaborer ainsi que les stagiaires que j'ai encadrés font partie de mon réseau (tableau 1 en annexe). De même que les doctorants de divers laboratoires de l'IUEM travaillant sur de nombreuses thématiques différentes, toujours reliées au milieu marin, que j'ai pu rencontrer au sein de l'association MerSciDoc (association des doctorants de l'EDSM).

3.6. Transférabilité de ces compétences

En tant que secrétaire de l'association Iroise Sub Aquatique (ISA)¹⁴ et membre du conseil d'administration de l'association MerSciDoc, je mets en œuvre mes **capacités de négociation, d'échange, de communication et de travail d'équipe** lors de chaque réunion du conseil d'administration.

J'ai organisé, dans le cadre du centre ISA, une petite conférence au cours de laquelle j'ai introduit les Algues Marines auprès d'un groupe de plongeurs amateurs.

4. Résultats et impacts de la thèse

4.1. Pour le laboratoire

Mes résultats de thèse permettent d'améliorer et de faire avancer les connaissances du laboratoire sur les **deux thématiques** phares du LEBHAM, à savoir :

- l'étude des substances naturelles issues des végétaux marins
- la connaissance des peuplements végétaux.

¹⁴ Centre de Plongée ISA, Crozon-Morgat

Une partie de ces résultats ont été ou seront prochainement **valorisés** par des **publications** dans des revues scientifiques internationales et par des **communications** lors de congrès.

Mes résultats concernant le programme CRISP ont permis au LEBHAM de remplir sa part du contrat de recherche et d'apporter sa « pierre » à la **connaissance de la biodiversité des récifs coralliens** au sein du Pacifique Sud.

Mes résultats de thèse ont aussi contribué au positionnement du LEBHAM au sein du GDR « BioChiMar ».

Un doctorant ayant démarré sa thèse en octobre 2008 utilise la technique HRMAS pour distinguer les espèces sur lesquelles il travaille.

4.2. Pour les partenaires du projet

Une partie des résultats de mes travaux de thèse rentrant dans le cadre du projet CRISP a fait l'objet d'une **communication par voie d'affiche** au cours du 5th ECNMP¹⁵ à Ischia (Italie) en septembre 2007. Mes travaux de thèse ont permis de mieux appréhender la notion de biodiversité spécifique et chimique au sein des algues du Pacifique Sud.

4.3. Personnel

Ces trois années de thèse sont pour moi une **première expérience professionnelle** valorisante et formatrice. Ma thèse m'a permis de me découvrir des **capacités à l'encadrement et à la création**. Je suis très fière que certains de mes résultats puissent être publiés et valorisés par des articles scientifiques ou des communications lors de congrès (liste de ma production scientifique en annexe).

Même si j'ai vécu des moments de doute en ayant des difficultés à prendre du recul sur mon travail, je me suis toujours **senti soutenue** par ma directrice de thèse, ce qui m'a permis d'aller de l'avant et de continuer.

Cette expérience de trois années de doctorat a conforté l'intérêt que je portais au milieu marin. Pour la suite, je souhaiterai continuer à travailler en relation avec la **biologie marine** et plus particulièrement dans une optique de **sauvegarde de la biodiversité** et de **communication** avec le grand public.

Néanmoins, je suis consciente de la difficulté de trouver un travail dans ce domaine, c'est pourquoi je m'intéresse aussi aux secteurs des **biotechnologies** et de la **recherche en cosmétique marine**. Plusieurs entreprises ayant un secteur « **Recherche et Développement** » dans ces domaines existent dans la région brestoise. Une telle expérience me permettrait de découvrir la recherche en milieu industriel et de me confronter à des impératifs et des contraintes différentes de celles que j'ai rencontrés jusqu'alors.

¹⁵ 5th ECNMP : 5th European Congress in Marine Natural Products

ANNEXES

Tableau 1 : Compétences humaines (techniques et scientifiques) mises à disposition de mon projet de thèse

Compétences humaines	Prénom et Nom	Fonction	Rôle dans le projet de thèse	Organismes de rattachement	Domaine de recherche
Internes au LEBHAM	Christine Gager	Secrétaire			
	Isabelle Bihannic	Technicienne	Aide ponctuelle		
	Marie-Aude Poullaouec	Technicienne			
	Valérie Stiger-Pouvreau	Directrice de thèse	Encadrement	LEBHAM – IUEM – UBO	Biologie végétale
Externes au LEBHAM	Nelly Kervarec	Ingénieur d'étude	Analyses en RMN + Comité de thèse	RMN, UBO	
	Stéphane Cérantola	Ingénieur de recherche	Analyses en RMN	RMN, UBO	
	Edouard Kraffe	Maître de conférences	Aide en chimie + Comité de thèse	UMR 6521, CNRS, UBO	
	Stéphane Labarre	Chargé de Recherche	Comité de thèse	UMR 7139, CNRS, Roscoff	
	Arlette Longeon	Ingénieur d'étude	Tests antiinflammatoires (CRISP)	FRE 3206, CNRS, Paris	Chimie
	Marie-Lise Bourguet-Kondracki	Chargée de Recherche	Tests antiinflammatoires (CRISP)	FRE 3206, CNRS, Paris	
	Thierry Cresteil	Chargé de Recherche	Tests antitumoraux (CRISP)	UPR 2301, CNRS, Gif/Yvette	
	Jean-François Biard	Professeur	Tests neurotoxiques (CRISP)	ISOMER, Université de Nantes	
	André Margaillan	Professeur	Accueil dans son équipe (1 mois)	EA 4323, Université du Sud	
	Claude Payri	Professeur	Echantillonnage + Comité de thèse	UMR 148, IRD, Nouméa	Ecologie
	Vassilios Roussis	Professeur	Aide sur l'identification de molécules	Université d'Athènes	Chimie
Stagiaires	Xavier Bodériou				
	Camille Jégou				
	Claire Ferret	Master 1	Stagiaires pendant 2mois	IUEM, UBO	Biologie marine
	Charlène Spagnol				
	Elise Van Mee				
	Ambrosine Cudennec				
				Université de Lille 1	

Tableau 2 : Tableau des dépenses liées aux ressources humaines. Toutes les sommes sont exprimées en euros. Les stagiaires n'étant pas rémunérés, leur salaire potentiel a été estimé sur la base d'un salaire de technicien débutant.

Ressources Humaines	Salaire brut mensuel	Charges patronales	coût total mensuel	Temps passé sur le projet	coût total environné	Origine
Doctorante	1658,25	497,47	2155,72	100% soit 36 mois sur 3 ans	77606,10	UBO
Encadrante	2760,00	828,00	3588,00	35% soit 12,6 mois sur 3 ans	45208,80	UBO
Secrétaire (50%)	749,58	224,87	974,45	5% soit 1,8 mois sur 3 ans	1754,02	UBO
Technicienne (80%)	1323,65	397,095	1720,74	5% soit 1,8 mois sur 3 ans	3097,34	UBO
Technicienne (100%)	1654,56	496,37	2150,93	5% soit 1,8 mois sur 3 ans	3871,68	UBO
Stagiaires (non rémunérés)	1357,47	407,24	1764,71	2 mois par an, 6 stagiaires	21176,53	Stagiaires
Sous-total Ressources Humaines					152714,47	

Tableau 3 : Tableau croisé des dépenses et des origines des fonds. Toutes les sommes sont exprimées en euros.

		Origine						Total
		UBO	LEBHAM	CRISP	Région	Personnel	EDSM	
Nature	Ressources Humaines	113 387 €	-	-	-	-	-	21 177 € 134 564 €
	Consommables	-	2 376 €	1 875 €	-	75 €	-	- 4 326 €
	Infrastructures	5 850 €	900 €	999 €	-	-	-	- 7 749 €
	Matériel (amortissements)	-	2 617 €	851 €	-	800 €	-	- 4 267 €
	Déplacements	-	210 €	4 272 €	800 €	-	-	- 5 282 €
	Formation	-	23 €	23 €	-	1 040 €	1 065 €	- 2 151 €
	Documentation et communication	-	1 136 €	-	-	-	-	- 1 136 €
	Soutenance de thèse	-	3 250 €	-	-	-	-	- 3 250 €
	Total	119 237 €	10 511 €	8 020 €	800 €	1 915 €	1 065 €	21 177 € 162 725 €

Klervi LE LANN, 2009. Etude de la biodiversité des Sargassaceae (Fucales, Phaeophyceae) en milieu tempéré et tropical : écologie, chimiotaxonomie et source de composés bioactifs.

Mots clés : *Bifurcaria*, *Cystoseira*, *Sargassum*, *Turbinaria*, Bretagne, Pacifique Sud, Ecologie chimique, Composés phénoliques, Fucoxanthine, Acide Turbinarique, Ecotypes, Acides gras, Eleganolone, Activité antioxydante, Activité antiradicalaire, Activité anti-inflammatoire, Activité cytotoxique, Activité neurotoxique.

Résumé : Quatre genres de Sargassaceae présentant de forte biomasse en Bretagne et/ou dans le Pacifique Sud ont été choisis comme modèles de cette étude. Les objectifs étant i) de mieux comprendre l'écologie chimique des Sargassaceae en milieu tempéré et en milieu tropical, ii) de rechercher des chimiomarqueurs spécifiques à certaines espèces et iii) de rechercher de molécules potentiellement bioactives. Ainsi, un travail pluridisciplinaire a été entrepris avec l'étude de l'écologie chimique des Sargassaceae, en Bretagne d'une part, via l'étude des variations spatio-temporelles de certains composés de défenses synthétisés par *Sargassum muticum*, *Bifurcaria bifurcata* et *Cystoseira baccata* associé à un suivi écologique de ces espèces et dans le Pacifique Sud d'autre part, via l'étude de ces mêmes composés de défenses au sein de *Turbinaria sp.* et *Sargassum sp* provenant de différents sites. Parallèlement, deux études de chimiotaxonomie ont été menées. D'une part sur le genre *Turbinaria* afin d'identifier un ou des chimiomarqueur(s) permettant de discriminer *T. ornata* et de *T. conoides*. Et d'autre part sur *B. bifurcata* afin de mieux comprendre la répartition géographique des types chimiques existants au sein de cette espèce. Puis, pour répondre au troisième objectif de cette thèse, trois activités biologiques ont été recherchées en priorité au sein des espèces étudiées: la cytotoxicité, l'activité anti-inflammatoire et la neurotoxicité. Les résultats de cette étude ont permis i) de mettre en évidence l'impact des conditions environnementales sur les variables biologiques et écologiques étudiées chez ces espèces en milieu tempéré comme en milieu tropical ; ii) d'identifier l'acide turbinarique comme étant un chimiomarqueur de l'espèce *T. conoides* et de mettre en évidence l'existence d'écotypes chez *B. bifurcata* ; iii) de rapporter l'activité anti-phospholipase A₂ d'acides gras issus d'algues du Pacifique Sud et l'activité antiradicalaire et antioxydante de l'éleganolone isolée chez *B. bifurcata*.

Klervi LE LANN, 2009. Study of the biodiversity of Sargassaceae (Fucales, Phaeophyceae) in temperate and tropical climate: ecology, chemotaxonomy and source of bioactive compounds.

Mots clés : *Bifurcaria*, *Cystoseira*, *Sargassum*, *Turbinaria*, Brittany, South Pacific, Chemical ecology, Phenolic compounds, Fucoxanthin, Turbinaric Acid, Ecotypes, Fatty acids, Eleganolone, Antioxidant activity, Antiradicalaire activity, Anti-inflammatory activity, Cytotoxic activity, Neurotoxic activity.

Résumé :

Four Sargassaceae genus presenting high biomass in Brittany and/or in the South Pacific were chosen as models of this study. The aims of this work were i) to understand the chemical ecology of Sargassaceae in temperate and tropical environment, ii) to characterize specific chemomarkers from certain species and iii) to identify potential bioactive molecules. Then, a pluridisciplinary work was carried out with the study of the chemical ecology of Sargassaceae, in Brittany on one hand, with the study of the spatio-temporal variations of certain defense compounds of *Sargassum muticum*, *Bifurcaria bifurcata* and *Cystoseira baccata* associated with an ecological survey of these species and in the South Pacific on the other hand, with the study of these same defense compounds within *Turbinaria sp.* and *Sargassum sp* from various sites. At the same time, two chemotaxonomical studies were led. On the *Turbinaria* genera to identify one or several chemomarker(s) allowing discriminating *T. ornata* and *T. conoides*. And on the other hand, on *B. bifurcata* to understand the geographical distribution of the existing chemical types within this species. Then, to answer the third objective of this work, three biological activities were looked for first and foremost within the studied species: cytotoxicity, anti-inflammatory activity and neurotoxicity. The results allowed i) to highlight the impact of the environmental conditions on the biological and ecological variables studied to these species in temperate and tropical environments; ii) to identify the acid turbinaric as a chemomarker of *T. conoides* and to highlight the existence of ecotypes from *B. bifurcata* ; iii) to report the anti-phospholipase A₂ activity of fatty acids stemming from tropical seaweeds and the antiradical and antioxidant activities of eleganolone isolated from *B. bifurcata*.